

**Die Rolle von AGD12
bei phototroper und gravitroper Signaltransduktion
in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christian Michalski

aus Florstadt

Marburg/Lahn, 2017

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von November 2010 bis März 2017 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Paul Galland durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Paul Galland

Zweitgutachter: PD Dr. Christoph Forreiter

Tag der Disputation: _____

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Dümmer, M., Michalski, C., Forreiter, C., and Galland, P. (2015)

Phenotypic Reversal in *Arabidopsis thaliana*: Sucrose as a Signal Molecule Controlling the Phenotype of Gravi- and Phototropism Mutants. *Journal of Plant Growth Regulation* 35, 430–439.

Dümmer, M., Michalski, C., Essen, L.-O., Rath, M., Galland, P., and Forreiter, C. (2016)

EHB1 and AGD12, two calcium-dependent proteins affect gravitropism antagonistically in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 206, 114–124.

Michalski, C., Dümmer, M., Galland, P., and Forreiter, C. (2017)

Impact of EHB1 and AGD12 on Root and Hypocotyl Phototropism in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Growth Regulation* 1–9.

Zusammenfassung

Durch Licht oder Schwerkraft induziertes gerichtetes Wachstum von Pflanzen wird als Phototropismus bzw. Gravitropismus bezeichnet. Diese werden unterteilt in Reizwahrnehmung, Signalweiterleitung und einer abschließenden photo- bzw. gravitropen Reaktion. In höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* erfolgt die Wahrnehmung von Licht über den Blaulicht-Photorezeptor Phototropin. Die Wahrnehmung von Schwerkraft wird hingegen durch die Sedimentation stärkehaltiger Statolithen unterstützt, wobei der tatsächliche Schwerkraftrezeptor gegenwärtig unbekannt ist. Weitere Details zur daran anschließenden frühen Signalweiterleitung von Photo- und Gravitropismus sind ebenso unbekannt. Erst die durch ARFs gesteuerte Umverteilung von PIN-Proteinen über das Trans-Golgi-Netzwerk bildet den nächsten bekannten Zwischenschritt in der gemeinsamen Signaltransduktion von Photo- und Gravitropismus. Das Resultat ist eine Verlagerung des Auxintransports, Aufbau eines Auxingradienten und schließlich asymmetrisches Wachstum.

Die Resultate dieser Arbeit verdeutlichen, dass AGD12 und EHB1 als positiver bzw. negativer Effektor der photo- und gravitropen Signaltransduktion fungieren. So konnte gezeigt werden, dass eine *agd12 loss-of-function* Mutante im Vergleich zum Wildtyp einen verringerten Photo- und Gravitropismus aufweist. Ein Phänotyp der diametral zur hypergravitropen *ehb1-2*-Mutante ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass beide Proteine *in vivo* mit dem für Phototropismus essentiellen NPH3-Protein interagieren. Ebenfalls wurden mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System Interaktionen von AGD12 und EHB1 mit diversen ARF Proteinen *in vivo* nachgewiesen, welche essentiell für die gemeinsame Signalweiterleitung von Photo- und Gravitropismus sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Befunde durch konfokalmikroskopische Untersuchungen an Keimlingen untermauert, die AGD12:GFP und EHB1:GFP konstitutiv exprimieren. So lokalisierten beide Fusionsproteine als Folge einer Behandlung mit Brefeldin A in sogenannten BFA-Kompartimenten, was auf eine Assoziation von AGD12 und EHB1 mit dem Trans-Golgi-Netzwerk schließen lässt. Damit wird die nachgewiesene Interaktion mit NPH3 und diversen ARFs durch eine gemeinsame Lokalisation mit AGD12 und EHB1 gestützt. *In silico* modellierte Ca^{2+} -Bindestellen bei AGD12 und EHB1 legen nahe, dass ihre Funktion durch Ca^{2+} moduliert werden kann. Parallel dazu konnte durch Zugabe von Ca^{2+} in das Wachstumsmedium gezeigt werden, dass der Gravitropismus von Pflanzen ohne AGD12 und EHB1 weit geringer durch Schwankungen der externen Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst wird. Daher ist zu vermuten, dass beide Proteine über Ca^{2+} -Signale an der frühen gravitropen Signaltransduktion beteiligt sind. Dabei könnte die unmittelbare Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Schwerkraftstimulus zu einer Ca^{2+} -Bindung an AGD12 und EHB1 führen, deren Funktionalität modulieren und so die Signaltransduktion fortgeführt werden.

Es ist anzunehmen, dass beide Proteine um die jeweilige Bindung an NPH3 und diversen ARFs in Konkurrenz stehen und sich daraus ihre gegensätzliche Wirkung auf die Tropismen ergibt. So stellt AGD12 die eigentliche Verbindung zwischen NPH3 und diversen ARFs dar, indem es den zyklischen GTP/GDP-Austausch an ARFs und somit die Bildung von Transportvesikeln ermöglicht. Eine Bindung mit EHB1 hingegen unterbindet diesen GTP/GDP-Austausch aufgrund der fehlenden Arf-GAP-Domäne, was die Rolle von EHB1 als negativen Effektor erklärt. Der Umstand, dass homologe Proteine wie AGD11 und AGD13 ebenso positiven Einfluss auf Photo- und Gravitropismus ausüben, lässt vermuten, dass weit mehr Proteine an diesen und anderen physiologischen Reaktionen beteiligt sind. Demnach bestimmt das Verhältnis zwischen AGD-Proteinen und den EHB1-verwandten CAR-Proteinen die Intensität einer Reaktion auf diverse Umweltreize wie Licht und Schwerkraft.

Summary

The growth of plants directed by light or gravity is referred as phototropism or gravitropism. They are generally subdivided into stimulus perception, signal transduction and a final phototropic or gravitropic reaction. In higher plants such as *Arabidopsis thaliana*, light is detected by the blue-light receptor phototropin. The perception of gravity, on the other hand, is supported by the sedimentation of starch-containing statoliths. But the genuine gravity receptor is presently unknown. Further details on the subsequent early signal transduction of photo- and gravitropism are also unknown. Only the ARF-controlled redistribution of PIN proteins via the trans-Golgi network is the next known intermediate step in the common signal transduction of photo- and gravitropism. The results are changes of the auxin transport, the development of an auxin gradient, and asymmetric growth, finally.

The outcome of this work shows that AGD12 and EHB1 act as a positive and negative effector of photo- and gravitropism signal transduction. Thus, it was shown that the loss-of-function mutant *agd12-9* compared with wildtype has a reduced photo- and gravitropism. A phenotype that is contrary to the hypergravitropic mutant *ehb1-2*. In addition, it was shown that both proteins interact *in vivo* with the NPH3 protein essential for phototropism. Similarly, yeast two-hybrid system interactions of AGD12 and EHB1 with various ARF proteins were demonstrated *in vivo*, which are essential for the common signal propagation of photo- and gravitropism. Within the scope of this work, these findings were confirmed by confocal microscopy studies on seedlings expressing AGD12:GFP and EHB1:GFP constitutively. Both fusion proteins localized as a result of treatment with Brefeldin A in so-called BFA compartments, suggesting an association of AGD12 and EHB1 within the trans-Golgi network. Thus the demonstrated interaction with NPH3 and various ARFs is supported by a common localization with AGD12 and EHB1. *In silico* modeled Ca^{2+} binding sites within AGD12 and EHB1 suggest that their function can be modulated by Ca^{2+} . In parallel, the addition of Ca^{2+} into the growth medium showed that the gravitropism of plants without AGD12 and EHB1 were far less sensitive to fluctuations in the external Ca^{2+} concentration. Therefore, both proteins are likely involved in the early gravitropic signal transduction via Ca^{2+} signals. The instantaneous increase of the cytosolic Ca^{2+} concentration after gravity stimulation could lead to Ca^{2+} binding to AGD12 and EHB1, which gets functionally modulated and initiate further signal transduction.

It is to be assumed that both proteins are in competition with the respective binding to NPH3 and various ARFs, resulting in their opposing effect on photo- and gravitropisms. On the one hand, AGD12 represents the actual link between NPH3 and various ARFs by enabling the cyclic GTP/GDP exchange to ARFs and thereby the formation of transport vesicles. Binding with EHB1 on the other hand, prevents this GTP/GDP exchange due to the lack of an Arf-GAP domain, which explains the role of EHB1 as a negative effector. The fact that also homologous proteins such as AGD11 and AGD13 show a positive influence on photo- and gravitropism suggests that far more proteins are involved in these and other physiological reactions. Therefore, probably the ratio between AGD proteins and EHB1-related CAR proteins determines the intensity of a reaction to various environmental stimuli such as light and gravity.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	9
1. 1. Perzeption von Schwerkraft.....	10
1. 1. 1. Statolithen.....	10
1. 1. 2. Calciumionen	11
1. 1. 3. Cytoskelett	12
1. 2. Perzeption von Licht.....	13
1. 2. 1. Phytochrom.....	13
1. 2. 2. Cryptochrom	14
1. 2. 3. Phototropin.....	14
1. 3. Die Proteine EHB1 und AGD12.....	16
1. 3. 1. ENHANCED BENDING 1	16
1. 3. 2. ARF-GAP DOMAIN 12.....	18
1. 3. 3. Familie der AGD-Proteine	19
1. 4. Adenosyl-Ribosylierungs-Faktoren.....	20
1. 4. 1. Einordnung der ARF-Proteine	20
1. 4. 2. Funktion von ARF und GEF.....	20
1. 5. Bedeutung von Auxin bei Photo- und Gravitropismus.....	22
1. 5. 1. Säure-Wachstum und Cholodny-Went-Hypothese	22
1. 5. 2. Auxintransport durch PIN und AUX1	24
1. 6. Ziele der Arbeit	25
2. Materialien	26
2. 1. Organismen.....	26
2. 2. Oligonukleotide/Primer	27
2. 3. Plasmide/Vektoren	29
2. 4. Chemikalien	30
2. 5. Lösungen und Gemische	33
2. 6. Enzyme.....	36
2. 7. Kommerzielle Kits	36
2. 8. Interferenzfilter.....	37
2. 9. Gerätschaften und Zubehör.....	38
2. 10. Programme und Websites	39
3. Methoden	40
3. 1. Molekularbiologische Grundtechniken.....	40
3. 1. 1. gDNA-Extraktion	40
3. 1. 2. Polymerase-Ketten-Reaktion	40
3. 1. 3. RNA-Extraktion.....	42
3. 1. 4. Reverse Transkription	42
3. 1. 5. Verifizierung der Mutante <i>agd12-9</i>	42
3. 1. 6. Restriktion von DNA.....	43
3. 1. 7. DNA-Gelelektrophorese.....	43
3. 1. 8. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	43

3. 1. 9. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	44
3. 1. 10. Plasmid-Minipräparation aus <i>E. coli</i>	44
3. 1. 11. Gateway-Klonierung	45
3. 1. 12. Pflanzenanzucht für quantitative PCR	45
3. 1. 13. Effizienzbestimmung für quantitative PCR	46
3. 1. 14. Quantifizierung von AGD-Expression.....	48
3. 1. 15. Analyse von Nukleotid- und Protein-Sequenzen	48
3. 1. 16. Klonierung der AGD-Expressionsvektoren.....	49
3. 1. 17. Herstellung kompetenter Zellen von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
3. 1. 18. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
3. 1. 19. Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	51
3. 1. 20. Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels <i>floral dip</i>	52
3. 1. 21. Selektion und Zucht nach T-DNA-Insertion in <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
3. 1. 22. Zucht von AGD12-Komplementation und DR5::GUS-Linien	55
3. 2. Interaktionsanalyse <i>in vivo</i> mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	57
3. 2. 1. Grundlagen des Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	57
3. 2. 2. Klonierung von Hefe-Expressionsvektoren.....	58
3. 2. 3. Herstellung chemisch kompetenter Hefen.....	59
3. 2. 4. Transformation chemisch kompetenter Hefen	60
3. 2. 5. Lagerung transformierter Hefezellen	60
3. 2. 6. Interaktionsstudien mittels Dropout-Medium.....	61
3. 2. 7. Interaktionsstudien mittels α -Galaktosidase-Assay	62
3. 3. Physiologische Experimente mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
3. 3. 1. Vorbereitung: Oberflächensterilisation und Brechen der Samenruhe.....	63
3. 3. 2. Allgemeiner Versuchsaufbau zu Phototropismus und Gravitropismus.....	63
3. 3. 3. Längenbestimmung von <i>agd12-9</i> und Columbia 8	65
3. 3. 4. Dosis-Wirkungs-Kurven für Hypokotyl-Phototropismus.....	65
3. 3. 5. Kinetik des Hypokotyl-Phototropismus von <i>agd12-9</i>	65
3. 3. 6. Wurzel-Phototropismus von <i>agd12-9</i> und <i>ehb1-2</i>	66
3. 3. 7. Untersuchungen zum Gravitropismus durch Inklinatation.....	66
3. 3. 8. Kinetik des Gravitropismus von <i>agd12-9</i>	66
3. 3. 9. Clinostat-Zentrifugation von <i>agd12-9</i>	66
3. 3. 10. Statolithen-Färbung in Wurzelspitzen von <i>agd12-9</i>	67
3. 3. 11. Gravitropismus von <i>agd12-9</i> in Abhängigkeit von NPA.....	67
3. 3. 12. Addition von gravitropen und phototropen Reizen bei <i>agd12-9</i>	67
3. 3. 13. Tropismen von <i>agd12-9</i> und <i>ehb1-2</i> in Abhängigkeit von Ca^{2+}	68
3. 3. 14. Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	68
3. 3. 15. Unterstützer der praktischer Arbeit	69
4. Ergebnisse	70
4. 1. Interaktionsstudien zu AGD12 und EHB1 in Hefe	70
4. 1. 1. Erstellung von Expressionsvektoren für Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse	70
4. 1. 2. Interaktionsanalysen auf Dropout-Medium	73
4. 1. 3. Interaktionsanalysen mit α -Galaktosidase-Assay	77
4. 2. Aufbau und Expression der AGD-Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
4. 2. 1. Phylogenie der AGD-Proteine	79
4. 2. 2. AGD-Expression in Abhängigkeit von Licht	80

4. 2. 3. Promotor-Analyse der Gene <i>AGD11</i> , <i>AGD12</i> , <i>AGD13</i> und <i>EHB1</i>	82
4. 3. Charakterisierung der Mutante <i>agd12-9</i>	84
4. 3. 1. Verifizierung der Mutante <i>agd12-9</i>	84
4. 3. 2. Längenwachstum der Mutante <i>agd12-9</i>	85
4. 3. 3. Hypokotyl-Phototropismus der Mutante <i>agd12-9</i>	86
4. 3. 4. Wurzel-Phototropismus der Mutante <i>agd12-9</i>	88
4. 3. 5. Gravitropismus der Mutante <i>agd12-9</i> in Abhängigkeit von Saccharose	90
4. 3. 6. Clinostat-Zentrifugation der Mutante <i>agd12-9</i>	91
4. 3. 7. Statolithenfärbung in Wurzelspitze der Mutante <i>agd12-9</i>	93
4. 3. 8. Kinetik des Gravitropismus der Mutante <i>agd12-9</i>	94
4. 3. 9. Gravitropismus der Mutante <i>agd12-9</i> in Abhängigkeit von NPA	95
4. 3. 10. Addition von gravitropen und phototropen Reizen auf <i>agd12-9</i>	97
4. 4. Einfluss von Calcium auf Tropismen der Mutanten <i>agd12-9</i> und <i>ehb1-2</i>.....	98
4. 4. 1. Vergleich der Proteinsequenz von AGD12 und EHB1	98
4. 4. 2. Längenwachstum in Abhängigkeit von CaCl ₂ und CaO	99
4. 4. 3. Hypokotyl-Gravitropismus in Abhängigkeit von Calcium	100
4. 4. 4. Wurzelgravitropismus in Abhängigkeit von Calcium	103
4. 4. 5. Hypokotyl-Phototropismus in Abhängigkeit von Calcium	106
4. 5. Überexpression von AGD12 und dessen Homologen	108
4. 5. 1. Erstellte Expressionsvektoren für GFP-Fusionsproteine.....	108
4. 5. 2. AGD12-Überexpression in <i>N. benthamiana</i>	110
4. 5. 3. Übersicht erstellter und gekreuzter Überexpressionslinien in <i>Arabidopsis</i> ..	112
4. 5. 4. Lokalisation von AGD12:GFP und EHB1:GFP in <i>Arabidopsis thaliana</i>	113
4. 5. 5. Untersuchungen zum Gravitropismus von AGD12-Überexpressionslinien...	116
4. 5. 6. Untersuchungen zum Phototropismus von AGD12-Überexpressionslinien..	118
4. 5. 7. Vergleich der Proteinsequenzen von AGD11, AGD12 und AGD13	119
4. 5. 8. Überexpression von AGD11 und AGD13 in <i>N. benthamiana</i>	120
4. 5. 9. Untersuchungen zu Tropismen von AGD11-Überexpressionslinien.....	121
4. 5. 10. Untersuchungen zu Tropismen von AGD13-Überexpressionslinien.....	123
5. Diskussion	125
5. 1. AGD12 und EHB1 beeinflussen Photo- und Gravitropismus	126
5. 2. Interaktion, Expression und Lokation von AGD12 und EHB1	128
5. 3. Calcium als Modulator von AGD12 und EHB1	132
5. 4. Zusammenfassung	137
6. Literaturverzeichnis	139
7. Anhang/Plasmid-Karten.....	158
Lebenslauf	171
Erklärung	172

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure	kb	Kilo-Basenpaare
AbA	Aureobasidin A	LB	lysogeny broth
ACT1	Actin 1	Leu	Leucin
Ade	Adenin	LiAc	Lithiumacetat
AGD	Arf-GTPase-activating protein	mRNA	messenger RNA
Amp	Ampicillin	MS	Murashige & Skoog
AmpR	Ampicillin-Resistenz	NEB	New England Biolabs
ARF	ADP ribosylation factor	NLS	Nuclear Localization Signal
ARF	Auxin-Response-Factor	NOS	Nopaline-Synthase
ARL	ADP ribosylation factor (ARF)-like	NPA	2-(1-Naphthylcarbonyl)benzoesäure
AUX1	AUXIN RESISTANT 1	NPH	Non Phototropic Hypocotyl
AuxRE	Auxin-Response-Element	NPL1	Non Phototropic Hypocotyl 1-Like
BFA	Brefeldin A	nt	Nukleotid
bp	Basenpaare	NTC	No Template Control
CaLB	Calcium/lipid-binding	OD	Optische Dichte
CAR	C2-domain ABA-related	PBE-Box	PIF binding E-box
cDNA	complementary DNA	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CDS	codierende Sequenz	PEG	Polyethylenglykol
CmR	Chloramphenicol-Resistenz	PHOT	Phototropin
Col	Columbia	PHY	Phytochrom
COP	coat protein complex	PIF	Phytochrome Interacting Factor
CRY	Cryptochrom	PIN	PIN-FORMED
Ct	cycle threshold	PNP- α -Gal	4-Nitrophenyl- α -D-Galaktopyranosid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid	PTGS	post transcriptional gene silencing
DD	double dropout	QD	quadruple dropout
DMSO	Dimethylsulfoxid	qPCR	quantitative real-time-PCR
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	rpm	Umdrehungen pro Minute
EHB1	Enhanced Bending 1	RT	Reverse Transkription
FC	fold change	S3S1	Sucrose box3 and SURE1 element
F _{Zf}	Zentrifugalkraft	Sacc	Saccharose
GAL4-AD	GAL4-Aktivierungsdomäne	SAR	Secretion Associated Ras
GAL4-BD	GAL4-Bindedomäne	SDS	Natriumdodecylsulfat
GAP	GTPase-activating protein	Spec	Spectinomycin
gDNA	Genomische DNA	SpR	Spectinomycin-Resistenz
GEF	Guanine nucleotide exchange factors	SURE1	sucrose-responsive element 1
GFP	green fluorescent protein	TBSV	Tomato Bushy Stunt Virus
GTP	Guanosintriphosphat	TD	triple dropout
HAc	Essigsäure	T-DNA	transferierte DNA
HAP6	Hapless 6	TIBA	2,3,5-triiodobenzoic acid
His	Histidin	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HO1	Heme Oxygenase 1	Trp	Tryptophan
Hyg	Hygromycin	UBC9	Ubiquitin Conjugating Enzyme 9
HygR	Hygromycin-Resistenz	UTR	Untranslated Region
Hypo	Hypokotyl	Y2H	Hefe-2-Hybrid
Kan	Kanamycin	yADH1	Hefe-Alkoholdehydrogenase 1
KanR	Kanamycin-Resistenz		

1. Einleitung

Von jeher unterliegen Lebewesen den Gegebenheiten ihrer Umwelt. Dabei wirken sich diverse Umwelteinflüsse, je nach Lebensweise und Anpassungsvermögen, unterschiedlich aus. Das Vermögen gegebenen Umwelteinflüssen zu trotzen, ihnen auszuweichen oder zum eigenen Vorteil zu nutzen, bedingt, ob ein Lebewesen in der Lage ist zu überleben, sich fortzupflanzen und somit seine Gene an die nächste Generation weiterzugeben. Dieses Prinzip, dass am besten an ihre Umwelt angepasste Organismen die größten Chancen auf Überleben und Fortpflanzung haben, gehört zur Grundidee der heutigen Evolutionslehre nach Charles Darwin (Darwin, 1859). Wenig später von Herbert Spencer mit „*Survival of the Fittest*“ umschrieben (Spencer, 1864), macht die Evolutionslehre deutlich, wie wichtig die Anpassung von Lebewesen an ihre Umwelt ist und dass die heute existierenden Formen des Lebens Produkte einer mehr als 3,5 Milliarden Jahre andauernden natürlichen Selektion durch Umweltfaktoren darstellen (Knoll und Barghoorn, 1977). Diese Umweltfaktoren werden im Allgemeinen in biotische und abiotische Umweltfaktoren unterteilt. Erstere beschreiben Wechselwirkungen mit anderen Organismen, wie beispielsweise Konkurrenz um Nahrung und sexuelle Fortpflanzung, Symbiosen, Räuber-Beute-Beziehungen oder Selektionsdruck durch Parasitismus und Krankheit. Abiotische Umweltfaktoren stellen dagegen unter anderen Licht, Temperatur, Wasser, Gravitation, mechanische Faktoren oder Art des Untergrunds dar.

Bedingt durch ihre sessile Lebensweise ist ein Umgehen ungünstiger Umweltfaktoren bei Pflanzen oft nicht möglich. Folglich ist eine Anpassung an diese unausweichlichen Umweltbedingungen überlebensnotwendig. Zwei dieser stets Einfluss ausübenden Faktoren sind Gravitation und die am Standort vorherrschenden jeweils aktuellen Lichtbedingung. Beide können wahrgenommen werden und lösen verschiedene physiologische Reaktionen aus. Dabei sind sowohl Licht als auch Gravitation maßgeblich an der Orientierung und Ausrichtung der Pflanze in ihrer Umwelt beteiligt. So begünstigt eine Ausrichtung zum Licht eine optimale Absorption von Photonen und folglich eine optimale Photoassimilation in oberirdischen Pflanzenorganen. Die Ausrichtung zum Erdmittelpunkt hingegen begünstigt eine feste Verbindung mit dem Untergrund und die Aufnahme von Wasser und Nährsalzen über die Wurzel. Diese Formen der Bewegung, bedingt durch Licht und Gravitation, werden als Phototropismus und Gravitropismus bezeichnet. Sie lassen sich unterteilen in Perzeption des Reizes, Signaltransduktion und letztlich phototrope bzw. gravitropen Reaktion. Die Abläufe bei beiden Tropismen wurden in den vergangenen Jahrzehnten bereits ausführlich ergründet. Fragestellungen, wie die wahrgenommenen Reize im Detail per Signaltransduktion in eine Reaktion münden, existieren jedoch bis heute (Briggs, 2014; Fankhauser und Christie, 2015; Sato et al., 2015; Vandenbrink et al., 2014).

Die folgende Arbeit widmet sich der Beantwortung noch offener Fragen zum Gravitropismus und Phototropismus bei Landpflanzen. Als Modelorganismus wurde *Arabidopsis thaliana* aus der Familie der Kreuzblütler ausgewählt. Dank vorangegangenen physiologischen Untersuchungen und einer vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana*, konnte bereits eine Vielzahl von Proteinen charakterisiert werden. Darunter auch Proteine mit Einfluss auf Gravi- und Phototropismus. Die dem Tropismus zugrunde liegende Signaltransduktion konnte gegenwärtig jedoch noch nicht gänzlich entschlüsselt werden. So führt die Suche nach bislang unentdeckten Mitgliedern dieser Signaltransduktionskette zum Protein ARF-GAP DOMAIN 12/AGD12, welches möglicherweise Einfluss auf die Signaltransduktion beider Tropismen hat. Folglich befasst sich diese Arbeit primär mit der potentiellen Rolle von AGD12 bei Photo- und Gravitropismus und wird zusätzlich die Rollen der verwandten Proteine EHB1, AGD11 und AGD13 beleuchten.

1. 1. Perzeption von Schwerkraft

Die Wahrnehmung des Schwerkraftvektors im Raum ist Grundvoraussetzung für die daran anschließende Signaltransduktion und gravitrope Reaktion bei Pflanzen (Kiss et al., 1989; Sæther und Iversen, 1991). Diese Wahrnehmung wird durch Statocyten, spezialisierte Zellen mit Stärke-Statolithen in Hypokotyl und Wurzel, gewährleistet (Haberlandt, 1900; Němec, 1900). So sind Statocyten in der Stärkescheide des Hypokotyls, als auch in der inneren Columella der Wurzelspitze vorzufinden und essentiell für den Gravitropismus der Pflanze (Blancaflor et al., 1998). Die darin enthaltenen Amyloplasten fungieren dabei als Stärke-Statolithen, welche aufgrund ihrer höheren Dichte innerhalb der Zelle entlang des Schwerkraft-Vektors sedimentieren (Abb. 1A). Die bereits 1900 postulierte Stärke-Statolithen-Theorie betrachtet diese Sedimentation der Statolithen als Grundvoraussetzung der Perzeption von Schwerkraft (Haberlandt, 1900; Němec, 1900). So können betreffende Zellen anhand der Bewegung und Position der in ihnen enthaltenen Statolithen Schwerkraft wahrnehmen. Eine Wahrnehmung, die vermutlich auf der Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle durch Statolithen beruht (Gehring et al., 1990; Plieth und Trewavas, 2002; Sievers et al., 1984). Der Umstand, dass Pflanzen ohne Statolithen dennoch bedingt gravitrop reagieren, lässt seit längerem Spielraum für alternative Theorien (Caspar und Pickard, 1989). So ist es möglich, dass der Protoplast der Zelle im Fall einer Inklinatation der Pflanze selbst Druck auf entsprechende Ionenkanäle ausübt (Wayne et al., 1990). Versuche, die resultierende gravitrope Reaktion zu beschreiben, erfolgten bereits vor über hundert Jahren. So ermöglicht beispielsweise das Sinusgesetz (Sachs, 1865), mit der Formel $S_{\text{Gravi}} = g \times \sin \alpha$, Gravitropismus als Resultat einer Inklinatation von bis zu 90° zu beschreiben (Iino et al., 1996; Pickard, 1973). Dabei wird die Stärke des Schwerkraftstimulus (S_{Gravi}) durch die Erdbeschleunigung (g) und den Sinus des Inklinationswinkels (α) bestimmt. Jedoch führen höhere Inklinationswinkel zwischen 120° bis 135° entgegen dem Sinusgesetz zu noch stärkeren gravitropen Reaktionen (Galland, 2002; Metzner, 1929). Folglich wurde in der Vergangenheit mehrfach versucht, das ursprüngliche Sinusgesetz um eine zusätzliche Cosinus-Komponente zu ergänzen (Larsen, 1969; Metzner, 1929).

1. 1. 1. Statolithen

Mit der Entdeckung von Pflanzen mit fehlerhafter Stärkesynthese war es möglich, den Einfluss der aus Stärke bestehenden Statolithen auf den Gravitropismus zu untersuchen. So zeigten sich im Fall stärkeloser Pflanzen drastisch reduzierte gravitrope Reaktionen (Kiss et al., 1989; Sæther und Iversen, 1991). Intermediäre Mutanten mit reduzierter Stärkesynthese untermauerten diese Beobachtung, da sie lediglich einen moderat reduzierten Gravitropismus aufzeigten (Kiss et al., 1996). Zudem konnte eine Korrelation zwischen der zur Pflanzenanzucht verwendeten Saccharosekonzentration, der daraus resultierenden Statolithengröße und dem Ausmaß der gravitropen Reaktion gezogen werden (Song et al., 1988). Dabei zeigte sich, dass stärkereiche bzw. größere Statolithen weitaus schneller sedimentieren (MacCleery und Kiss, 1999). Was mit einer stärkeren gravitropen Reaktion einhergeht (Kiss et al., 1997). Diese Sedimentation, wie auch die bloße Positionierung von Statolithen, ist in der Lage neben der Plasmamembran ebenso auf das kortikale ER der Zelle einzuwirken und dieses zu verformen (Leitz et al., 2009). Die Folge dieser Sedimentation ist unter anderem eine Alkalisierung des Cytoplasma betreffender Statocyten von pH 7,2 auf pH 7,6,

sowie eine Ansäuerung ihrer Zellwand von pH 5,5 auf pH 4,5. Eine sekundenschnelle Reaktion, die im Fall der stärkelosen Mutante *pgm1-1* nicht eintritt und somit die Bedeutung von Statolithen untermauert (Fasano et al., 2001).

1. 1. 2. Calciumionen

Neben Änderungen des pH-Werts innerhalb und außerhalb der Statocyten, haben Schwerkraftstimuli Auswirkungen auf die Konzentration von Ca^{2+} im Cytoplasma der Zelle. Eine genaue Aufschlüsselung des Einstroms von Ca^{2+} erlaubte eine Unterteilung der Reaktion in zwei Phasen (Plieth und Trewavas, 2002). Dabei folgt auf einen nahezu unmittelbaren Influx von Ca^{2+} 40 Sekunden nach Schwerkraftstimulus, ein nachgelagerter Ca^{2+} -Influx (Abb. 1B). Beide Calcium-Signale wurden in der Vergangenheit bezüglich ihrer Abhängigkeit von diversen Schwerkraftstimuli, Ca^{2+} -Kanal-Blocker und Komponenten des Cytoskelett getestet.

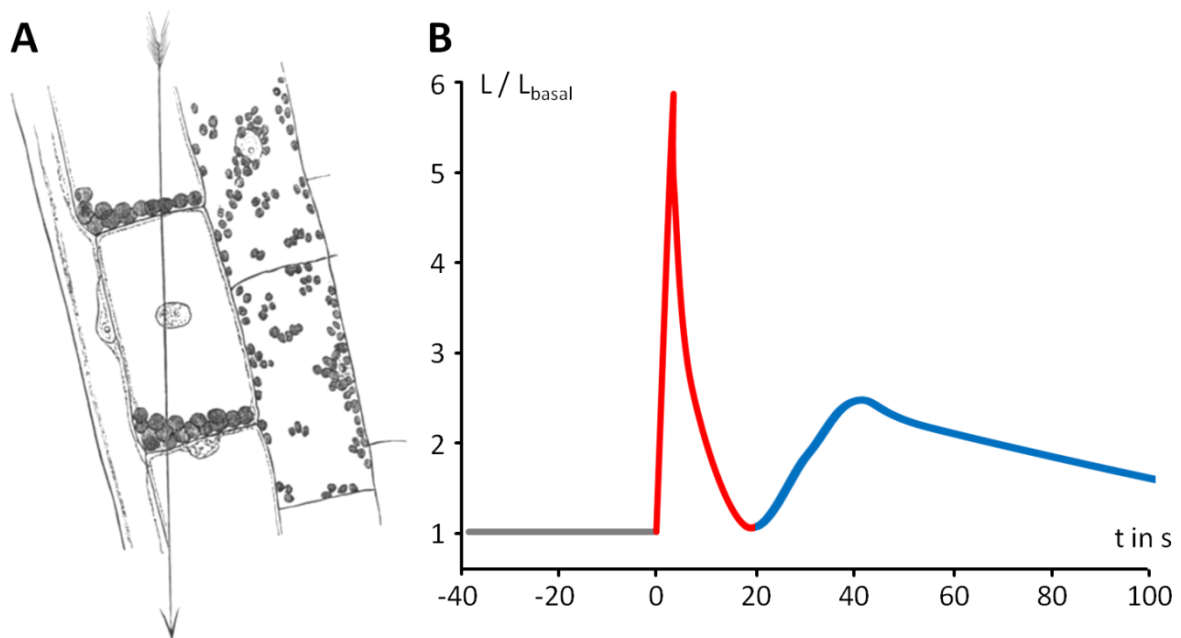


Abbildung 1: Verteilung von Statolithen und Einstrom von Ca^{2+} als Folge von Schwerkraftstimuli

(A) Darstellung einer Stärkescheide mit Statolithen (links) und Rindenparenchym mit Chloroplasten (rechts) nach 13° Inklination. Statolithen sind abhängig zur Inklination sedimentiert. Publiziert von Haberlandt, 1900. (B) Schematische Darstellung des biphasischen Ca^{2+} -Signals nach Schwerkraftstimulus durch 180° Inklination. Messungen der Ca^{2+} -Konzentration beruhten auf Aequorin basierender Fluoreszenz. In Folge vermehrter Calciumionen erhöhte Lumineszenz wurde mit der vorherigen Grundlumineszenz ins Verhältnis L/L_{basal} gesetzt. Signal wurde in (rot) instantanen und (blau) verzögertem Ca^{2+} -Influx unterteilt. Publiziert von Plieth und Trewavas, 2002.

So konnte gezeigt werden, dass der Winkel einer Inklination nur die Intensität des zweiten verzögerten Ca^{2+} -Signals beeinflusst. Erhöhungen der angelegten Erdbeschleunigung zeigten dagegen eine Erhöhung beider Signale (Toyota et al., 2008a). Zudem vergrößerte sich die Zeitspanne zwischen unmittelbarem und verzögertem Signal von 40 auf bis zu 60 Sekunden als Folge verringerter Gravitation bzw. Mikrogravitation (Toyota et al., 2013). Beide Signale zeigten eine Abhängigkeit von verfügbaren Ca^{2+} und entsprechenden Ca^{2+} -Kanälen. Jedoch erwies sich das instantane Ca^{2+} -Signal als komplett unabhängig, sowie das verzögerte Signal als extrem abhängig von endosomalen Ca^{2+} -Kanälen (Toyota et al., 2008a). Ebenso waren Auxin-Transport-Inhibitoren in der Lage das Ca^{2+} -Signal zu hemmen (Plieth und Trewavas, 2002; Toyota et al., 2008b). Zudem konnte gezeigt werden, dass der durch Schwerkraftstimulus ausgelöste Ca^{2+} -Influx abhängig von Aktinfilamenten des Cytoskelett ist (Toyota et al., 2008a). Letztlich hat ein Mangel oder Fehlen von Ca^{2+} eine reduzierte gravitrope Reaktion zur Folge (Perdue et al., 1988). So zeigt sich, dass Calciumionen in frühen Stadien des Gravitropismus bzw. der Perzeption von Schwerkraft eine Rolle spielen. Sie sind jedoch auch in späteren Phasen der Signaltransduktion präsent, bei denen es zur Änderung von Ca^{2+} -Konzentration und pH-Wert weiter entfernter Zellen der Elongationszone kommt (Gehring et al., 1990; Monshausen et al., 2011).

1. 1. 3. Cytoskelett

Untersuchungen an Aktinfilamenten und mit Aktin-assoziierten Proteinen haben gezeigt, dass diese, anders als Tubulin, einen Einfluss auf die Sedimentation von Statolithen und den dadurch ausgelösten Ca^{2+} -Influx haben (Toyota et al., 2008a). Dabei führt eine Depolymerisation von Aktinfilamenten durch Latrunculin B zu teils widersprüchlichen Veränderungen der gravitropen Reaktion. So zeigten in *Arabidopsis thaliana* nach Behandlung mit Latrunculin B Statolithen eine verringerte Sedimentation (Palmieri und Kiss, 2005) und Hypokotyle als Folge dessen einen verstärkten Gravitropismus, Wurzeln jedoch einen reduzierten Gravitropismus (Yamamoto und Kiss, 2002). Des Weiteren konnten die Phänotypen diverser Gravitropismus-Mutanten mit der Rolle von Aktin in Verbindung gebracht werden. So führen beispielsweise Mutationen des Cytoskelett-assoziierten Proteins ALTERED RESPONSE TO GRAVITY 1/ARG1 zu reduzierter Sedimentation von Statolithen (Neela et al., 2008). Folglich zeigte die *arg1*-Mutante keine übliche Änderung des pH-Werts nach Schwerkraftstimulus (Boonsirichai et al., 2003) und eine reduzierte gravitrope Reaktion (Sedbrook et al., 1999). Die Mutante *sgr9* zeigte ebenfalls reduzierte Statolithen-Sedimentation und Gravitropismus. Dabei handelte es sich im Fall des betroffenen Proteins SHOOT GRAVITROPISM 9/SGR9 um eine E3-Ligase. Diese moduliert F-Aktin, welches dadurch schwächer an Statolithen bindet und erleichtert auf diese Weise deren Sedimentation (Nakamura et al., 2011). Ebenso hat das für die Verzweigung von F-Aktion notwendige Protein ACTIN-RELATED PROTEIN 3/ARP3 Einfluss auf den Gravitropismus (Amann und Pollard, 2001). So weisen *arp3*-Mutationen eine Reduktion des Gravitropismus auf (Reboulet et al., 2010). Ein Phänotyp, der jedoch durch Behandlung mit Latrunculin B bzw. Zerstörung von Aktinfilamenten wieder normalisiert werden kann (Zou et al., 2016). Ob dabei Aktin als Bestandteil des Cytoskeletts nur Einfluss auf die Sedimentation von Statolithen hat oder zusätzlich an der nachfolgenden Signaltransduktion beteiligt ist, bleibt jedoch unklar.

1. 2. Perzeption von Licht

Der Phototropismus als eine Krümmungsreaktion bzw. Wachstum von Pflanzen in Richtung einer Lichtquelle, wurden bereits im 19. Jahrhundert von Charles und Francis Darwin untersucht (Darwin und Darwin, 1881). Die Grundvoraussetzung für lichtabhängige Reaktionen ist dabei die Wahrnehmung von Licht durch einen Photorezeptor. Dieser setzt sich in der Regel aus einem Apoprotein und Chromophor zusammen, wobei der Chromophor das Absorptionsspektrum des Photorezeptors bedingt. Die bisher bekannten Photorezeptoren in *Arabidopsis thaliana* sind größtenteils in die drei klassischen Photorezeptor-Familien der Phytochrome, Cryptochrome und Phototropine einzuordnen (Ahmad, 1999; Möglich et al., 2010). Zudem verfügt *Arabidopsis thaliana* mit UV-B RESISTANCE 8/UVR8 (Christie et al., 2012; Kliebenstein et al., 2002), ZEITLUPE/ZTL (Somers et al., 2000), LOV KELCH PROTEIN2/LKP2 (Schultz et al., 2001) und FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F BOX 1/FKF1 (Nelson et al., 2000) über weitere in jüngster Zeit entdeckte zusätzliche Photorezeptoren.

1. 2. 1. Phytochrom

Zu den ersten in Pflanzen entdeckten Photorezeptoren gehören die Phytochrome. Diese Familie von Rotlicht-Rezeptoren zeichnet sich im Fall pflanzlicher Phytochrome durch Phytochromobilin (Kohchi et al., 2001) und im Fall bakterieller Phytochrome durch Phycocyanobilin als Chromophor aus (Bhoo et al., 2001). Zudem besitzen sie die als Photochromozität bezeichnete Fähigkeit, ihr Absorptionsspektrum zu verändern. Ermöglicht wird dies über Isomerisierung des Chromophors nach Absorption von Rotlicht und Dunkelrotlicht (Andel et al., 1996; Butler et al., 1959; Rüdiger et al., 1983). Phytochrome gelten allgemein als lichtabhängige Sensorkinasen mit der Fähigkeit zur Autophosphorylierung (Fankhauser und Chory, 1999). Sie konnten bislang in Bakterien (Davis et al., 1999), Cyanobakterien (Hughes et al., 1997; Yeh et al., 1997), Pilzen (Blumenstein et al., 2005), Moosen (Hartmann et al., 1983; Jenkins und Cove, 1983) und höheren Pflanzen (Butler et al., 1959) nachgewiesen werden. Ihr Einfluss auf den jeweiligen Organismus ist dabei unterschiedlich. So führt die Wahrnehmung von Rotlicht durch Phytochrom bei *Aspergillus nidulans* zur Induktion asexueller Fortpflanzung (Blumenstein et al., 2005). Dagegen sind bei den Moosen *Physcomitrella patens* und *Ceratodon purpureus* entdeckten Phytochrome essentiell für den dort durch Rotlicht induzierten Phototropismus (Hartmann et al., 1983; Jenkins und Cove, 1983; Mittmann et al., 2009). In höheren Pflanzen sind Phytochrome unter anderem an der Wahrnehmung von Lang- und Kurztagbedingungen (Garner und Allard, 1922), Keimung und Blühinduktion (Borthwick et al., 1952a, 1952b), sowie Schattenflucht (Smith und Whitelam, 1997) beteiligt. Des Weiteren sind sie essentiell für die rotlichtabhängige Hemmung der Hypokotylelongation und Deetiolierung der Pflanze (Koornneef et al., 1980; Whitelam et al., 1993). Anders als bei Moosen liegt eine direkte Beteiligung von Phytochrom am Blaulicht-induzierten Phototropismus höherer Pflanzen nicht vor. Eine Modulation dieses Phototropismus durch Rotlicht bzw. Phytochrome ist jedoch möglich (Liu und Lino, 1996). Dies wird durch den Nachweis der Interaktion zwischen betreffenden Rot- und Blaulichtrezeptoren *in vivo* untermauert (Jaedicke et al., 2012). In *Arabidopsis thaliana* sind mit Phytochrom A (Dehesh et al., 1993; Nagatani et al., 1993; Whitelam et al., 1993), Phytochrom B (Reed et al., 1994), Phytochrom C (Qin et al., 1997), Phytochrom D (Franklin et al., 2003) und Phytochrom E (Devlin et al., 1998) fünf Phytochrome mit teilweise überlappenden Funktionen bekannt (Fankhauser, 2001).

1. 2. 2. Cryptochrom

Cryptochrome bilden die zweite Familie von Photorezeptoren in höheren Pflanzen. Aufgrund ihrer Fähigkeit Blaulicht und UV-Licht zu detektieren, stellten sie zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung aussichtsreiche Kandidaten dar um als Photorezeptoren für Phototropismus zu gelten. So war schon länger bekannt, dass Phototropismus höherer Pflanzen durch Blaulicht induziert wird (Darwin und Darwin, 1881). Neben dem stets vorhandenen Flavin besitzen einige Cryptochrome Pterin als zweites Chromophor, welches die Erweiterung des Absorptionsspektrums bedingt (Brautigam et al., 2004; Malhotra et al., 1995). Cryptochrome weisen eine hohe Übereinstimmung bzw. Verwandtschaft zu Photolyasen auf (Ahmad und Cashmore, 1993), welche unter anderem in höheren Pflanzen UV-lichtbedingte DNA-Schäden durch Absorption von Blau- oder UV-Licht photokatalytisch reparieren (Landry et al., 1997; Stapleton und Walbot, 1994). Dabei werden Cryptochrome und Photolyasen unter anderem über ihre Funktion als Photorezeptor bzw. Reparaturenzym unterschieden. Eine Einteilung, die durch die Entdeckung von Cryptochromen mit der Fähigkeit zur DNA-Reparatur teilweise aufgebrochen wird und mehr denn je den gemeinsamen Ursprung von Cryptochromen und Photolyasen unterstreicht (Bayram et al., 2008). *Arabidopsis thaliana* verfügt mit Cryptochrom 1 (Ahmad und Cashmore, 1993), Cryptochrom 2 (Hoffman et al., 1996) und Cryptochrom 3 (Kleine et al., 2003) über drei Cryptochrome. Diese sind unter anderem an der Steuerung blaulichtabhängiger Hemmung der Hypokotylelongation (Ahmad et al., 2002; Koornneef et al., 1980), sowie Anthocyan-Akkumulation (Ahmad et al., 1995) beteiligt und haben neben ZTL (Somers et al., 2000), LKP2 (Schultz et al., 2001) und FKF1 (Nelson et al., 2000) maßgeblichen Einfluss auf die circadiane Rhythmik von *Arabidopsis thaliana* (Somers et al., 1998). Cryptochrome sind außerdem in Menschen (Hsu et al., 1996; van der Spek et al., 1996), Maus (Kobayashi et al., 1998) und *Drosophila melanogaster* (Todo et al., 1996) vorzufinden und beeinflussen in diesen Organismen ebenso die circadiane Rhythmik (Emery et al., 1998; Griffin et al., 1999; van der Horst et al., 1999). Zudem sind sie essentiell für eine Orientierung von Zugvögeln und Insekten entlang des Erdmagnetfeldes (Gegear et al., 2008; Heyers et al., 2007; Möller et al., 2004). In höheren Pflanzen zeichnet dabei ebenso eine Art der Magnetosensibilität in Abhängigkeit von Cryptochrom ab. So zeigte die magnetische Feldstärke, in Anwesenheit von Cryptochrom und Blaulicht, einen Einfluss auf Hypokotylelongation und Anthocyan-Akkumulation in *Arabidopsis thaliana* (Ahmad et al., 2007). Zudem zeigte sich, dass der Einfluss von Cryptochrom auf die Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* mit dem der Phytochrome verbunden ist (Ahmad und Cashmore, 1997). Eine Verknüpfung welche durch die nachgewiesene Interaktion von Cryptochrom 1 mit Phytochrom A, sowie Cryptochrom 2 mit Phytochrom B *in vitro* untermauert wird (Ahmad et al., 1998; Más et al., 2000). Um den anfänglich erhofften Blaulichtphotorezeptor des Phototropismus handelt es sich bei den Cryptochromen jedoch nicht.

1. 2. 3. Phototropin

Letzten Endes konnten Phototropine als Rezeptoren des blaulichtabhängigen Phototropismus identifiziert werden (Liscum und Briggs, 1995). Strukturell zeichnen sich Phototropine durch eine Sensor- und eine Transmitterdomäne aus. Dabei setzt sich die Sensordomäne aus den zwei *Light-Oxygen-Voltage-sensing*/LOV-Domänen LOV1 und LOV2 zusammen, an welche je ein Flavin als Chromophor gebunden ist welches die Absorption von Blaulicht und UV-Licht ermöglicht (Christie et al., 1998,

1999). Dabei fungiert LOV2 als eigentlicher Sensor, der durch LOV1 reguliert wird (Christie et al., 2002; Salomon et al., 2000). Die Transmitterdomäne hingegen besitzt eine Serin/Threonin-Kinase, welche Phototropin lichtabhängig zu autophosphoryliert (Christie et al., 1998; Liscum und Briggs, 1995). Letztlich sind Sensor- und Transmitterdomäne über eine α -Helix miteinander verbunden (Harper et al., 2003). In Abwesenheit von Licht ist die LOV2-Domäne an der Serin/Threonin-Kinase gebunden und blockiert so eine Bindung von ATP (Matsuoka und Tokutomi, 2005; Nakasako et al., 2004). Bei Absorption von Blaulicht durch die LOV2-Domäne wird diese Blockade als Folge einer Konformationsänderung der verbindenden α -Helix aufgehoben (Harper et al., 2003). Dadurch kommt es zur Bindung von ATP und schließlich zur Autophosphorylierung von Phototropin (Christie et al., 1998; Fankhauser und Chory, 1999). In *Arabidopsis thaliana* liegen mit Phototropin 1/phot1 (Christie et al., 1998) und Phototropin 2/phot2 (Sakai et al., 2001) zwei Phototropine vor. Abhängig von ihren Sensordomänen, weisen diese eine unterschiedliche Sensitivität auf (Aihara et al., 2008). So ist phot1 in der Lage, sowohl Licht hoher als auch niedriger Fluenzraten zu detektieren, wogegen phot2 nur hohe Fluenzraten im Bereich von über $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ wahrnehmen kann (Christie et al., 1998; Sakai et al., 2001). Der durch beide Phototropine induzierte Phototropismus wird im Fall von phot2 folglich nur bei starker Belichtung ausgelöst. Beide Rezeptoren sind an der blaulichtabhängigen Öffnung von Stomata (Kinoshita et al., 2001) und Akkumulation von Chloroplasten bei geringen Fluenzraten beteiligt (Jarillo et al., 2001; Sakai et al., 2001). Die Fluchtbewegung von Chloroplasten vor zu starkem Lichteinfall ist dagegen eine exklusiv durch phot2 vermittelte Reaktion auf zu hohe Fluenzraten (Kagawa et al., 2001). Zudem werden die durch Phototropin bedingte Reaktionen höherer Pflanzen, durch Phytochrome beeinflusst (Kiss et al., 2003; Liu und Lino, 1996). Ebenso haben im Moos *Physcomitrella patens* Phototropine Einfluss auf den phytochromabhängigen Phototropismus durch Rotlicht. Ein Umstand der durch *in vivo* nachgewiesene Interaktionen zwischen beiden Photorezeptor-Familien aus *Physcomitrella* und *Arabidopsis* untermauert wurde (Jaedicke et al., 2012).

Auf Zellebene sind Phototropine meist im Bereich der Plasmamembran lokalisiert und interagieren mit Proteinen mit BTB/POZ-Domänen wie NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3/NPH3 (Motchoulski und Liscum, 1999) und ROOT PHOTOTROPISM 2/RPT2 (Inada et al., 2004). In *Arabidopsis thaliana* existieren 21 dieser pflanzenspezifischen BTB-NPH3-Proteine (Stogios et al., 2005). Diese können als Adapter für Phototropin und dessen CUL3-basierte Ubiquitinierung fungieren (Krek, 2003). So interagiert NPH3 mit CUL3 *in vivo* und ermöglicht so über einen CUL3-basierten E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex die Ubiquitinierung von phot1 in Abhängigkeit von Blaulicht. Als Folge dessen wird phot1 von der Zellmembran gelöst und anschließend abgebaut (Pedmale und Liscum, 2007; Roberts et al., 2011; Sakamoto und Briggs, 2002). Ein Mechanismus, der bei höheren Fluenzraten verstärkt einsetzt und vermutlich zur Desensibilisierung der Pflanze gegenüber einfallendem Lichtreiz dient. RPT2 hingegen zeigt keine Interaktion mit CUL3 (Dieterle et al., 2005), weist im Fall einer *rpt2*-Mutante jedoch eine Bedeutung für Wurzel- und Hypokotyl-Phototropismus auf (Okada und Shimura, 1992; Sakai et al., 2000). Während die Mutation von *RPT2* lediglich eine Verringerung des Phototropismus zur Folge hat, haben Mutationen bei *NPH3* ein komplettes Ausbleiben des Phototropismus zur Folge (Liscum und Briggs, 1995). Andere Phototropin-abhängige Antworten, wie Chloroplastenbewegung und Stomataöffnung, sind nicht durch NPH3 beeinflusst (Inada et al., 2004). Dieser Umstand macht NPH3 zu einem Protein, welches exklusiv und essentiell für den Phototropismus und dessen Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* ist.

1. 3. Die Proteine EHB1 und AGD12

1. 3. 1. ENHANCED BENDING 1

Aufgrund der essentiellen Bedeutung für den Phototropismus bei *Arabidopsis thaliana* gilt das Protein NPH3 als Adapter zwischen Phototropin und der weiteren Signaltransduktion bis hin zur phototropen Reaktion. Folglich wurden in der Vergangenheit in verschiedenen Arbeitsgruppen weitere Interaktionspartner von NPH3 zur Aufschlüsselung der nachfolgenden Signaltransduktionskette unter anderem durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System gesucht. Als Resultat dieser Suche, bei der in unserer Arbeitsgruppe NPH3 unter Blaulichbedingungen gegen eine cDNA-Bibliothek in einem speziellem Hefe-3-Hybrid-System mit Phototropin 1 als weiterem Interaktionspartner getestet wurde, konnte eine Interaktion zum Protein ENHANCED BENDING 1/EHB1 nachgewiesen werden (Knauer et al., 2011). Weitere *in vivo* Studien untermauerten die Interaktion zwischen NPH3 und EHB1, welche selbst die Bindungsstärke zwischen phot1 und NPH3 übersteigt (Abb. 3A). Überraschenderweise zeigte EHB1, obwohl es *in vivo* an die BTB-Domäne von NPH3 bindet, jedoch keine derartige Interaktion mit dem BTB-NPH3-Protein RPT2 (Masterthesis Michalski, 2010).

EHB1 (AT1G70800) ist ein kleines Protein mit einer Länge von 174 Aminosäuren und einer geschätzten Größe von 19 kDa (Abb. 3B). Es zeichnet sich vor allem durch eine *Calcium-Lipid-Binding* bzw. C2/CaLB-Domäne aus (Knauer et al., 2011), welche im Allgemeinen die Eigenschaft haben, mit Calciumionen, Zellmembranen oder Proteinen zu interagieren (Nalefski und Falke, 1996). Alternativ trägt EHB1 die Bezeichnung C2-DOMAIN ABA-RELATED 6/CAR6 und ist Mitglied der pflanzen-spezifischen Familie der CAR-Proteine, bestehend aus CAR1 bis CAR10 (Rodriguez et al., 2014). Mitglieder dieser Familie vermitteln eine calciumabhängige Bindung zwischen Membranen und ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Rodriguez et al., 2014). Die Bindung zwischen CAR-Proteinen und PYRABACTIN RESISTANCE/PYR bzw. PYRABACTIN RESISTANCE 1-LIKE/PYL scheint derart essentiell für die Wahrnehmung von ABA zu sein, dass diverse *car-triple*-Mutanten vermindert auf ABA reagieren (Rodriguez et al., 2014). Proteine innerhalb der CAR-Familie mit der größten Homologie zu EHB1/CAR6 stellen die Proteine CAR7 (AT1G70810) und CAR8 (AT1G23140) dar (Rodriguez et al., 2014 S2). Vergleichende Sequenzanalysen zeigten zudem, dass EHB1 große Übereinstimmungen mit dem Protein ARF-GAP DOMAIN 12/AGD12 aufweist (Knauer et al., 2011).

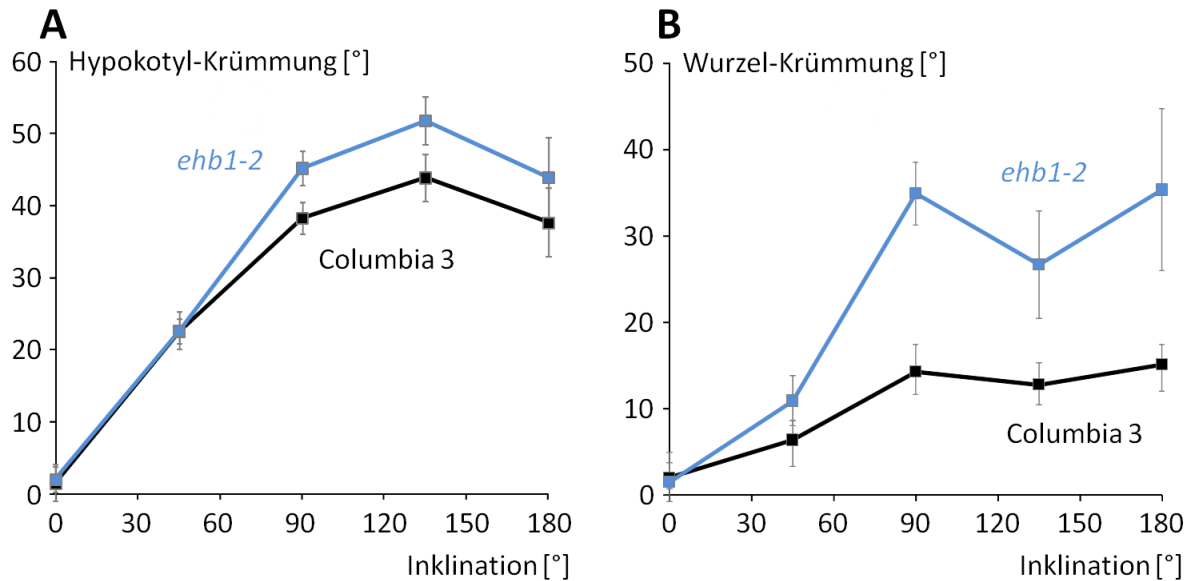


Abbildung 2: Hypergravitropismus der Mutante *ehb1-2*.

Gravitropismus bei (A) Hypokotyl und (B) Wurzel vier Tage alter Keimlinge der Mutante *ehb1-2* und deren Wildtyp Columbia 3 nach 24 Stunden Inklination drei Tage alter etiolierter Keimlinge um 0° bis 180. Übernommen aus Dümmer et al., 2015a, 2016.

Untersuchungen der *ehb1*-Mutante *ehb1-2* untermauerten die Verbindung zwischen EHB1 und NPH3. So zeigten Keimlinge der *ehb1*-Mutante als Folge von Blaulichtbestrahlung eine erhöhte phototrope Reaktion des Hypokotyls (Knauer et al., 2011; Michalski et al., 2017). Zudem zeigten Keimlinge der Mutante *ehb1-2* einen Phänotyp im Gravitropismus, bei dem Hypokotyl und Wurzel hypergravitrop reagierten (Dümmer et al., 2015b, 2015a, 2016; Knauer et al., 2011). Ein Phänotyp, der jedoch durch Zugabe von Saccharose während der Anzucht revertiert werden konnte (Dümmer et al., 2015a). Dabei waren die Wachstumsraten von *ehb1-2* in Abhängigkeit von Saccharose vergleichbar mit denen von Wildtyp-Keimlingen. So führte eine Applikation von Saccharose zur Reduktion des Hypokotyl-Wachstums und zur Förderung des Wurzel-Wachstums (Dümmer et al., 2016a; Kircher und Schopfer, 2012). Die Expression eines EHB1:GFP-Konstrukts unter Kontrolle eines 35S-Promotors in *Arabidopsis thaliana* erlaubten zudem Rückschlüsse auf die Lokalisation von EHB1. So waren EHB1:GFP-Fusionsproteine im Bereich des Zellkerns, Cytoplasma und Plasmamembran vorzufinden. Im Detail konnte zudem eine erhöhte Fluoreszenz der EHB1:GFP-Fusionsproteine an apikalen und basalen Bereichen von Hypokotyl- und Wurzelzellen beobachtet werden (Diplomarbeit Midon, 2006).

1. 3. 2. ARF-GAP DOMAIN 12

ARF-GAP DOMAIN 12/AGD12 aus *Arabidopsis thaliana* ist ein 37 kDa großes Protein mit einer zum Teil hohen Übereinstimmung mit EHB1 (Knauer et al., 2011). So besitzen beide Proteine eine C2/CaLB-Domäne, was eine Calcium-abhängige Assoziation mit Phospholipiden nahe legt (Jensen et al., 2000). Zuzüglich dazu besitzt AGD12 eine *Arf GTPase-Activating Protein*-Domäne/Arf-GAP-Domäne als N-terminale Verlängerung, welche EHB1 fehlt (Abb. 3B). Über diese ist AGD12 in der Lage *in vitro* mit den ADP-Ribosilierungsfaktoren ARFA1C und ARF3 aus *Arabidopsis thaliana* zu interagieren und deren GTPase-Aktivität zu fördern (Jensen et al., 2000). AGD12 wird vor allem in Blüte, Blattrosette und Wurzeln exprimiert und ist vornehmlich im Bereich von Golgi und Plasmamembran lokalisiert. Dabei wird die Bindung von AGD12 mit diversen Phospholipiden durch Calciumionen beeinflusst (Jensen et al., 2000; Min et al., 2007). Zudem zeigten Untersuchungen im Hefe-Zwei-Hybrid-System, dass AGD12 ähnlich wie EHB1 mit dem für Phototropismus essentiellen Protein NPH3 interagiert (Michalski et al., 2017). Eine Interaktion mit dem zu NPH3 verwandten Protein RPT2 blieb dagegen aus (Masterthesis Michalski, 2010).

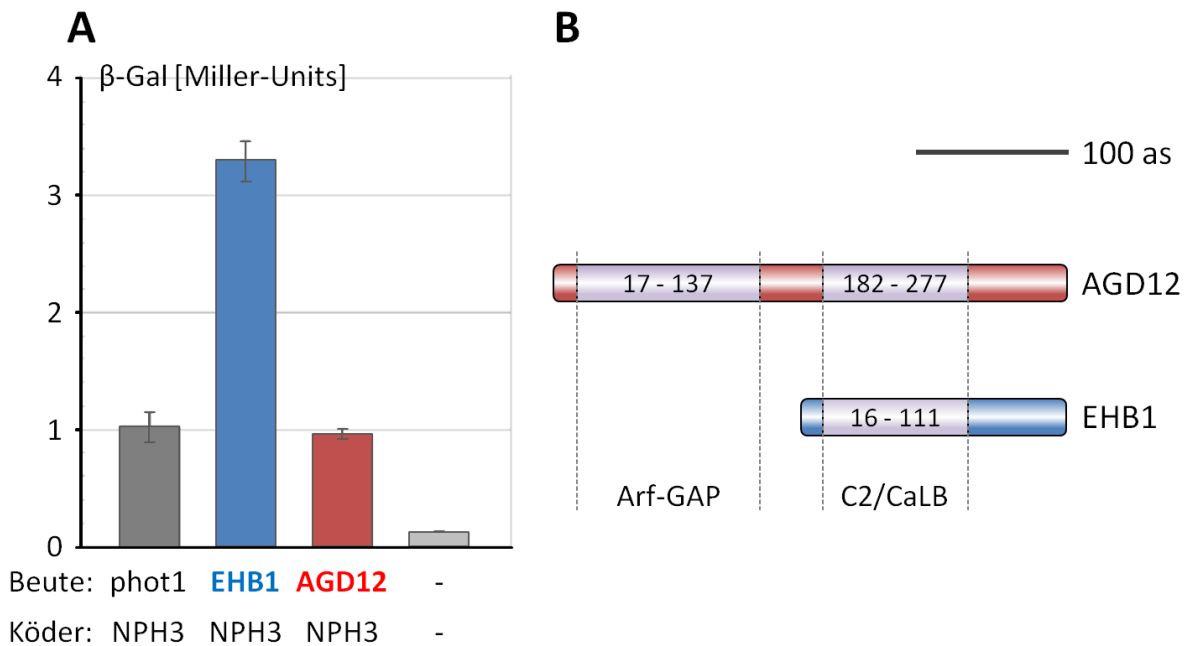


Abbildung 3: Aufbau und Interaktion von EHB1 und AGD12 in Hefe-Zwei-Hybrid-System.

(A) Interaktionsstudie mittels β -Galaktosidase-Assay im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit NPH3 als Köderprotein und phot1, EHB1 und AGD12 als Beuteprotein sowie einer Negativkontrolle. (B) Schematische Darstellung von AGD12 und EHB1, inklusive Position der Arf-GAP-Domäne und C2/CaLB-Domänen. Bestimmt mittels SMART. Größenstandard entspricht 100 Aminosäuren. M. Dümmer, übernommen aus Michalski et al., 2017.

1. 3. 3. Familie der AGD-Proteine

Neben AGD12 sind noch weitere Proteine mit Arf-GAP-Domäne in *Arabidopsis thaliana* vorzufinden und bilden gemeinsam eine Gruppe von *GTPase-Activating Protein/GAP*, die in *Arabidopsis thaliana* als ARF-GAP-DOMAIN/AGD-Proteine bezeichnet werden. GAPs sind an der Deaktivierung kleiner G-Proteine beteiligt, indem sie diesen helfen, die Hydrolyse von gebundenen GTP zu katalysieren (Abb. 4). Dabei sind GAPs mit Arf-GAP-Domäne in der Regel mit dem Golgi-Apparat assoziiert (Cukierman et al., 1995). In *Arabidopsis thaliana* bilden GAPs bzw. AGD-Proteine, ähnlich wie die Familie humaner GAPs (Donaldson und Jackson, 2000), eine sehr heterogene Familie mit 15 Proteinen. Abhängig von ihrer Sequenz werden diese in die Klassen 1 bis 4 unterteilt (Abb. 15; Vernoud et al., 2003). AGD-Proteine der Klasse 1 umfassen AGD1 bis AGD4 und können als eine Klasse aus dem Protein SCARFACE/SCF/VAN3/AGD3 und dessen Homologe bezeichnet werden. So zeigten Pflanzen mit *scf*-Mutation starke Defizite bei der Bildung von Leitbündeln in Blättern. Ein Phänotyp, der im Fall zusätzlicher Mutationen der Gene *AGD1*, *AGD2* und *AGD4* verstärkt wurde (Sieburth et al., 2006). Zudem wiesen bei *agd1*-Mutanten Wurzelhaare, in Verbindung mit einer gestörten Anordnung von Mikrotubuli, ein untypisch wellenförmiges Wachstum auf (Yoo et al., 2008).

Klasse 2 der AGD-Proteine setzt sich aus den Proteinen AGD5 bis AGD10 zusammen. Das darin enthaltene Protein NEVERSHED/NEV/AGD5 ist unter anderem an der Abszission älterer Blätter und Blüten beteiligt (Liljegen et al., 2009), ist im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert und interagiert dort mit dem kleinen G-Protein ARFA1C (Stefano et al., 2010). Mutation in *AGD8* und *AGD9* führten hingegen zu fehlerhafter Samenbildung. Zudem konnte gezeigt werden, dass AGD8 und AGD9 in der Lage sind, ARFA1C aus dem Cytosol hin zum Golgi-Apparat zu rekrutieren (Min et al., 2013). AGD7 war dagegen nicht in der Lage, ARFA1C zu rekrutieren sondern repräsentiert einen Gegenspieler von AGD8 und AGD9. So hemmte AGD7 bei Überexpression den anterograden Transport von Proteinen und förderte zeitgleich den Proteintransport vom Golgi-Apparat hin zum ER (Min et al., 2007). Das Protein ROOT AND POLLEN ARF-GAP/RPA/AGD10 dagegen zeigte eine Assoziation mit dem Golgi-Apparat, Interaktion und Aktivierung von ARFA1C und ist am Wachstum von Pollenschlauch und Wurzelhaaren beteiligt (Song et al., 2006).

AGD-Proteine der Klassen 3 und 4 sind dem entgegen bislang nicht genauer untersucht. Einzig für AGD12 sind Details zu Expression, Lokalisation und chemische Eigenschaften erforscht (Jensen et al., 2000). So fehlen bisher Informationen über dessen Homologe AGD11 und AGD13, welche ebenfalls über eine N-terminale Arf-GAP-Domäne und C-terminale C2/CaLB-Domäne verfügen. Ähnlich verhält es sich im Fall der Klasse 4 AGD-Proteine AGD14 und AGD15, welche beide über eine sehr kurze Sequenz mit lediglich einer Arf-GAP-Domäne verfügen (Vernoud et al., 2003). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt bleiben somit Erkenntnislücken in Bezug auf AGD-Proteine, welche maßgeblich an der Aktivität kleiner G-Proteine beteiligt sind.

1. 4. Adenosyl-Ribosylierungs-Faktoren

1. 4. 1. Einordnung der ARF-Proteine

Adenosyl Ribosylation Factors/ARFs bilden eine weit verbreitete Unterfamilie kleiner GTPasen. Sie gehören zur Familie der Ras-ähnlichen GTPasen, welche der Superfamilie der P-loop GTPasen zuzuordnen sind und allgemein als kleine G-Proteine bezeichnet werden (Leipe et al., 2002). Ras-ähnlichen GTPasen sind in vielen Lebewesen vorzufinden und sind unterteilt in die Unterfamilien Sar1/Arf, *Ras-related in brain*/Rab, *Ras-related nuclear protein*/Ran, *Rat sarcoma*/Ras und *Ras homologue*/Rho (Kahn et al., 1992; Takai et al., 2001). Wobei sich die Subfamilie der Sar1/Arf - GTPasen in *ADP-ribosylation factor*/ARF und *Secretion-associated RAS-related protein 1*/Sar1-GTPasen unterteilt. Mit Ausnahme von Ran-GTPasen haben alle kleinen G-Proteine die Eigenschaft membranständig vorzuliegen (Jékely, 2003).

In Pflanzen sind bis auf Ras-GTPasen alle Unterfamilien Ras-ähnlicher GTPasen vorzufinden (Jékely, 2003; Vernoud et al., 2003). Zudem werden in Pflanzen Rho-GTPasen als *Rho GTPases in plants*/Rop-GTPasen bezeichnet (Li et al., 1998). Diese können mittels Auxin aktiviert und durch Abszinsäure inaktiviert werden (Lemichez et al., 2001; Tao et al., 2002). *Arabidopsis thaliana* besitzt beispielsweise mit 22 Arf-, 57 Rab-, 4 Ran- und 11 Rop-GTPasen insgesamt 93 kleine G-Proteine (Jékely, 2003; Vernoud et al., 2003). Die Unterfamilie der 22 Arf-GTPasen in *Arabidopsis thaliana* beinhaltet dabei GTPasen mit der Bezeichnung *ADP-ribosylation factor*/ARF, *ARF-like*/ARL und *Secretion-Associated Ras*/SAR (Clark et al., 1993; Moss und Vaughan, 1998; Vernoud et al., 2003). Diese zeigen Homologie zu anderen Arf-GTPasen aus Mensch und Hefe. So gibt es starke Übereinstimmungen zwischen der Untergruppe der ARFA-GTPasen aus *Arabidopsis thaliana* mit den humanen GTPasen ARF1 und ARF3. Des Weiteren beinhaltet die Untergruppe der SARA-GTPasen aus *Arabidopsis thaliana* drei Homologe der GTPasen Sar1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Vernoud et al., 2003). Ein Umstand, der es bereits ermöglichte eine Mutation von Sar1p in *Saccharomyces cerevisiae* durch SAR-GTPasen aus *Arabidopsis thaliana* zu komplementieren (d'Enfert et al., 1992).

1. 4. 2. Funktion von ARF und GEF

Kleine G-Proteine der ARF-Unterklasse sind in vielen Organismen maßgeblich an der Bildung von Transportvesikeln beteiligt. Dabei zirkulieren ARF-GTPasen in der Zelle zwischen Cytosol und Endomembransystem (Abb. 4). Dieser Prozess wird unter anderem durch Proteine der Gruppen *GTPase-Activating Protein*/GAP und *Guanine Nucleotide Exchange Factor*/GEF gesteuert (Moss und Vaughan, 1998). So liegen ARFs inaktiv mit gebundenem GDP im Cytosol gelöst vor und können nur sehr schwach mit Membranen interagieren bzw. an diese binden (Franco et al., 1995). GEFs sind in der Lage, das gebundene GDP durch ein GTP auszutauschen. Eine Reaktion, bei der die in allen GEFs vorzufindende Sec7-Domäne essentiell ist (Chardin et al., 1996; Donaldson und Jackson, 2000). Dieser Austausch führt zu einer Konformationsänderung der ARF-Proteine und als Resultat zur Stabilisierung der Bindung von ARF mit der Membran (Antonny et al., 1997). Ein Ablauf, der durch das Antibiotikum Brefeldin A unterbunden werden kann, indem Brefeldin A an den Komplex aus ARF,

GDP und GEF bindet, diesen stabilisiert und so einen Austausch verhindert (Peyroche et al., 1999; Robineau et al., 2000). Der anschließenden Bindung von ARF-Proteinen an die Membran folgt die Bildung eines Transportvesikel, indem COPI-, COPII- oder Clathrin-Proteine durch ARFs an Endomembranen rekrutiert werden (Kirchhausen, 2000). Dabei bestimmt das initiiierende ARF die Zusammensetzung des Transportvesikel und dessen Weg. So initiieren Arf1p und Arf2p aus *Saccharomyces cerevisiae* die Bildung von COPI-Vesikeln für den retrograden Transport vom Golgi-Apparat hin zum ER (Cosson und Letourneur, 1997; Gaynor und Emr, 1997). Sar1p-GTPasen aus *Saccharomyces cerevisiae* sind dagegen für die Bildung von COPII-Vesikeln zuständig, welche für den anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat benötigt werden (Barlowe et al., 1994; Kirchhausen, 2000; Wieland und Hartert, 1999). Abschließend können ARFs durch Hydrolyse des gebundenen GTP und resultierender Konformationsänderung von der Membran gelöst und damit inaktiviert werden. Jedoch bedarf es zusätzlich *GTPase-Activating Protein*/GAPs um diese kleinen GTPasen zu aktivieren, Phosphat abzuspalten und ARFs in einen im Cytosol gelösten inaktiven Zustand zurück zu führen (Abb. 4).

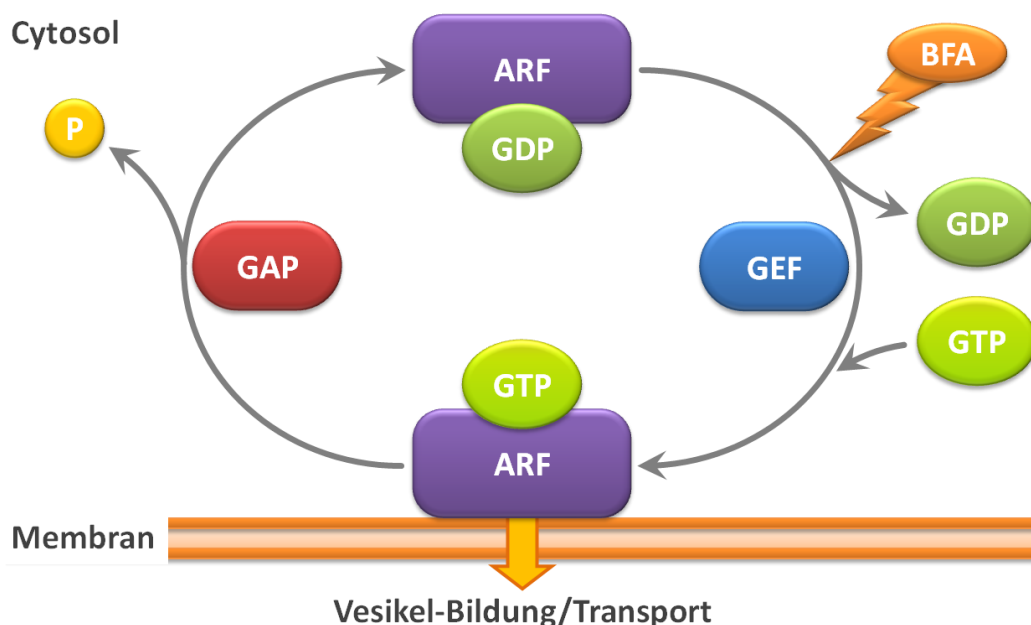


Abbildung 4: Zyklischer GTP/GDP-Austausch bei kleinen G-Proteinen am Beispiel von ARF-Proteinen

Schematische Darstellung der Modulation von Adenosyl-Ribosylierungs-Faktoren (ARF), die zusammen mit GDP im Cytosol gelöst vorliegen. Austausch von GDP mit GTP mittels GTP-Austauschfaktoren (GEF) bewirkt die Bindung von ARF an das Endomembransystem und initiiert die Bildung von Transportvesikeln. Brefeldin A (BFA) inhibiert die Abspaltung von GDP. Aktivierung der GTPase membranständiger ARFs durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) führt zur Hydrolyse von gebundenem GTP, Abspaltung von Phosphat sowie das Loslösen des ARF-Proteins von der Membran. Verändert nach Bento et al., 2013.

Damit sind ARFs, GAPs und GEFs essentiell für den Transport von beispielsweise Lipiden oder Proteinen innerhalb der Zelle. Folglich hat ein Eingriff in diese zyklische Modulation von ARF-Proteinen Auswirkungen auf den intrazellulären Transport. So weist im Fall von *Arabidopsis thaliana* die *arlc1*-Mutante *titan5* starke Veränderungen des Endosperm und Embryo auf (McElver et al., 2000). Des Weiteren führt eine Hemmung des anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat zur Erhöhung des mRNA-Level von *SARA1A* (Bar-Peled et al., 1995). Zudem zeigt sich, dass die *arfa1c*-Mutante *t31n* einen Zusammenbruch des Golgi-Apparats und gestörten Proteintransport aufweist. Damit entsteht

ein Phänotyp, welcher einer Behandlung mit BFA ähnelt (Lee et al., 2002). Eine Beobachtung, die zusätzlich die Bedeutung von GEFs aufzeigt. So sind neben 22 ARFs in *Arabidopsis thaliana* auch 8 GEFs vorzufinden, von denen GNOM der am besten beschriebene GEF ist und eine große Übereinstimmung zu Sec7 aus *Saccharomyces cerevisiae* aufweist (Shevell et al., 1994; Vernoud et al., 2003). So zeigen *gnom*-Mutationen Störungen bei der Ausrichtung von basalen und apikalen Geweben, Zellteilung und Zellexpansion und folglich eine fehlerhafte Embryogenese (Mayer et al., 1993; Shevell et al., 1994). Behandlungen der Pflanze mit BFA verdeutlichen zudem die Rolle des BFA-sensitiven GNOM-Proteins. So kommt es nach BFA-Behandlung zu einer drastischen Änderung der Golgi-Morphologie innerhalb der pflanzlichen Zelle und zur Entstehung von sogenannten BFA-Kompartimenten, gebildet aus endocytotischen und sekretorischen Vesikeln sowie Golgi-Stapeln (Geldner et al., 2003; Ritzenhaller et al., 2002). Eine Entwicklung, die zu fehlerhaftem Recycling und Verteilung von beispielsweise PIN1-Proteinen führt und damit den Auxintransport maßgeblich stört, was unter anderem einen beeinträchtigten Gravitropismus bei *Arabidopsis thaliana* zur Folge hat. Eine Behandlung, die im Fall einer Komplementation durch BFA-insensitive GNOM-Proteine weder zur Bildung von BFA-Kompartimenten, noch zu reduziertem Gravi- und Phototropismus führt (Ding et al., 2011; Geldner et al., 2003). Folglich kann von einem direkten Zusammenhang zwischen zyklischer Modulation von ARFs durch GEFs und der Umverteilung von Auxin bei Gravi- und Phototropismus ausgegangen werden.

1. 5. Bedeutung von Auxin bei Photo- und Gravitropismus

1. 5. 1. Säure-Wachstum und Cholodny-Went-Hypothese

Als eines der wichtigsten Phytohormone spielt Auxin unter anderem eine essentielle Rolle bei der Entstehung von phototroper und gravitroper Reaktion. So wurde bereits sehr früh ein Zusammenhang zwischen Auxin als „Wuchsstoff“ und Phototropismus vermutet (Briggs, 1963; Darwin und Darwin, 1881; Went, 1926). Dabei erfüllt Auxin, wie die meisten Phytohormone, mehrere Funktionen innerhalb der Pflanze. Eine davon ist die Förderung der Zellstreckung, welche durch die Säure-Wachstums-Hypothese beschrieben wird (Hager et al., 1971). Dabei löst Auxin innerhalb der Zelle die Aktivierung von Protonenpumpen und folglich eine Ansäuerung der um die Zelle befindlichen seitlichen Zellwand aus (Senn und Goldsmith, 1988). Dadurch aktivierte Expansine trennen anschließend Querverbindungen zwischen den einzelnen Cellulosemikrofibrillen der Zellwand auf. So geschwächte Zellwände geben dem vorliegenden Zellinnendruck nach und werden zusammen mit der Zelle geweitet. Eine parallel durch Auxin induzierte Neusynthese von Cellulosemikrofibrillen begünstigt zusätzlich die Erweiterung der Zellwand. Der Umstand, dass es sich dabei hauptsächlich um eine Schwächung, Weitung und letztlich Neusynthese der seitlichen Zellwände handelt, führt nicht zu einer gleichmäßigen Expansion zu allen Seiten. Stattdessen kommt es zu einer gerichteten Streckung der Zelle mittels Volumenzunahme (Abb. 5).

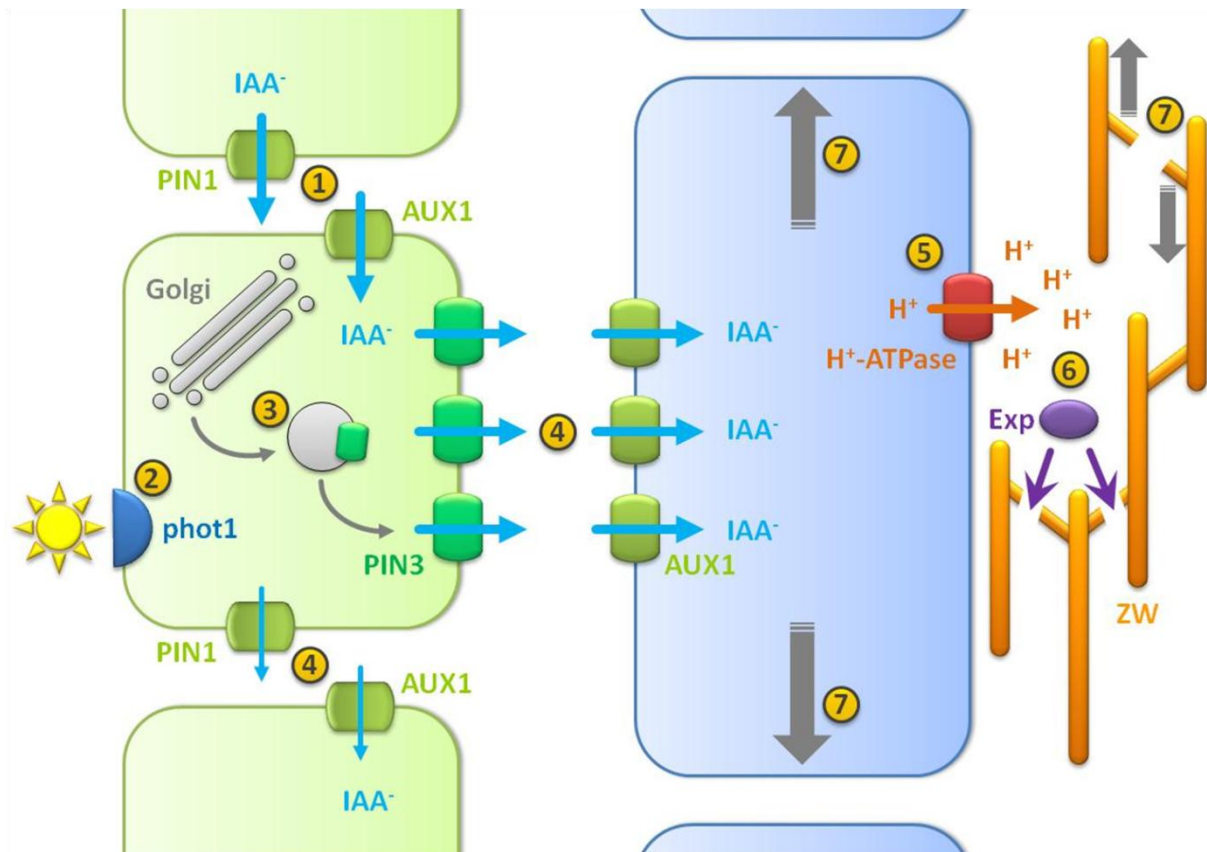


Abbildung 5: Zusammenspiel von Säure-Wachstum und Cholodny-Went-Hypothese

Schematische Darstellung der asymmetrischen Zellstreckung im Hypokotyl durch Auxinverteilung nach Perzeption von Blaulicht. (1) Auxin (IAA⁻) wird mittels PIN1 und AUX1 basipetal durch das Gewebe transportiert. (2) Blaulichtrezeptor phot1 detektiert Licht. (3) Als Folge dessen wird PIN3 mittels Trans-Golgi-Netzwerk verstärkt in die lichtabgewandte Zellmembran eingebaut. (4) Efflux von Auxin durch PIN3 schwächt den basipetalen Transport und verteilt Auxin in Licht abgewandte Zellschichten. Es bildet sich ein Auxingradient innerhalb des Hypokotyls. (5) Aktivierung von H⁺-ATPasen durch vermehrtes Auxin führt zur Protonierung der Zellwand (ZW). (6) Protonierung aktiviert Expansine (Exp), die Querverbindungen zwischen einzelnen Cellulosemikrofibrillen aufspalten. (7) So geschwächte Zellwand und somit die gesamte Zelle wird durch Zellinnendruck geweitet. Folglich expandieren Zellen mit höherer Auxinkonzentration auf der lichtabgewandten Seite stärker. Das daraus resultierende asymmetrische Streckungswachstum führt zu Krümmung des Hypokotyls hin zum Licht. Die Darstellung wurde als Zusammenfassung einschlägiger Publikationen dieses Themengebiets angefertigt.

Auf Gewebeebene entscheidet somit die Konzentration an intrazellulärem Auxin über die Zellstreckung jeder einzelnen Zelle bzw. von Zellverbänden. Ein Umstand, der bei der Cholodny-Went-Hypothese aufgegriffen wurde, bei der die Ungleichverteilung von Auxin innerhalb einer Coleoptile als Ursache für die phototrope bzw. gravitrope Krümmung beschrieben wird (Cholodny, 1924; Went, 1926). So konzentriert sich Auxin im Fall einer seitlichen Belichtung an der unbelichteten Seite und führt bei den dortigen Zellen zu einer verstärkten Zellstreckung. Das Resultat dieses asymmetrischen Wachstums ist die phototrope Krümmung der Coleoptile hin zum Licht. Ebenso zeigen Hypokotyle von *Arabidopsis thaliana* als Folge seitlicher gravitroper bzw. phototroper Stimulation eine Umverteilung von Auxin hin zur unteren bzw. weniger belichteten Seite des Hypokotyls (Friml et al., 2002). Woraufhin die daran anschließende verstärkte Zellstreckung in diesem Teil des Hypokotyls zu einer Krümmung dem Schwerkraft- bzw. Lichtreiz entgegen führt. Im Fall einer Inklinatation der Wurzel kommt es ebenso zu einer Umverteilung von Auxin hin zur unteren Seite des Organs (Hou et al., 2004; Rashotte et al., 2001). Hier jedoch resultiert die erhöhte Auxinkonzentration zu einer, im Ver-

gleich mit der oberen Wurzelseite, geringeren Zellstreckung und folglich einer gravitropen Krümmung der Wurzel in Richtung Erdmittelpunkt. So kommt der asymmetrischen Verteilung von Auxin, bedingt durch einen gerichteten Transport dieses Phytohormons, eine entscheidende Rolle beim Gravi- und Phototropismus zu.

1. 5. 2. Auxintransport durch PIN und AUX1

Der Transport und die daraus resultierende Verteilung von Auxin ist sowohl bei der Bildung einer basal-apikal-Achse während der Embryogenese, als auch bei Gravi- und Phototropismus der Pflanzen essentiell (Friml et al., 2002, 2003). Dabei stellt Auxin ein Signalmolekül für die Krümmungsreaktion dar, dessen Verteilung durch den ARF/GEF-abhängigem Vesikeltransport beeinflusst wird. Auf diese Weise kann es als Signalmolekül zwischen dem Ort der Reizwahrnehmung und dem Ort der Reaktion fungieren. Folglich führt sowohl die Behandlung mit BFA, als auch die Auxintransport-Inhibitoren TIBA und NPA, zu einer Unterbrechung dieser Signaltransduktionskette und letztlich zu einer verminderten gravitropen Reaktion der Pflanze (Geldner et al., 2001, 2003; Kleine-Vehn et al., 2010).

Dabei kommt den PIN-Proteinen als Auxin-Efflux-Carrier und dem Auxin-Influx-Carrier AUX1 eine zentrale Bedeutung zu. So sind diese maßgeblich für den Transport von Auxin innerhalb der Pflanze verantwortlich und werden über den ARF/GEF-abhängigen Proteintransport an der Zellmembran positioniert (Ding et al., 2011; Geldner et al., 2001). Folglich zeigen *gnom*-Mutanten unter anderem eine gestörte Verteilung des Auxin-Efflux-Carriers PIN1 (Steinmann et al., 1999). Zudem lassen sich PIN1-Proteine nach Behandlung mit Brefeldin A in BFA-Kompartimenten nachweisen (Geldner et al., 2001). So wird davon ausgegangen, dass PIN1 mittels trans-Golgi-Netzwerk zwischen Endomembranen und Plasmamembran zirkuliert (Geldner et al., 2001). Der Umstand, dass PIN1 an der basalen Zellmembran lokalisiert ist, bedingt seine Eigenschaft Auxin basipetal durch die Pflanze zu transportieren (Gälweiler et al., 1998; Okada et al., 1991). Zudem zeigt PIN1 Übereinstimmungen mit anderen eukaryotischen und bakteriellen Carrier-Proteinen auf (Gälweiler et al., 1998). Mutationen von PIN1 führen, ähnlich wie bei NPA-Behandlung, zu einer fehlerhaften Verteilung von vaskulären Geweben und nadelförmigen Blütenständen (Gälweiler et al., 1998; Okada et al., 1991).

Der Auxin-Efflux-Carrier PIN3 ist ebenfalls an der Plasmamembran und an Endomembranen lokalisiert. Anders als PIN1 wird PIN3 jedoch als Folge lateraler Lichtreize und Schwerkraftstimuli an die entgegengesetzte laterale Plasmamembran einer Zelle transportiert. Ein Vorgang, der ebenfalls durch Brefeldin A inhibiert werden kann (Ding et al., 2011; Friml et al., 2002). So ist PIN3 maßgeblich an der Bildung eines Auxingradienten durch lateralen Auxintransport beteiligt. Folglich weisen *pin3*-Mutanten, ähnlich einer *phot1*-Mutante, eine stark verminderte Umverteilung von Auxin nach seitlichen Lichtreizen auf und zeigen dem entsprechend verringerte phototrope und gravitrope Reaktionen (Ding et al., 2011; Friml et al., 2002).

Mutationen beim Auxin-Efflux-Carrier PIN2, sowie Auxin-Influx-Carrier AUX1 resultieren in ähnlichen Phänotypen. So zeigen *aux1*-Mutanten reduzierten Gravotropismus bei Wurzeln (Bennett et al., 1996). Zudem bleiben pH-Wert-Änderungen und Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, induziert durch Schwerkraftstimulus oder Auxin, bei der *aux1*-Mutante aus (Monshausen et al., 2011). PIN2 hat ebenfalls Einfluss auf das Verhalten der Wurzel und ist an der akropetalen Plasmamembran der Cortex-Zellen

der Wurzelspitze lokalisiert. Dem entsprechend zeichnen sich *pin2*-Mutanten durch einen reduzierten Gravitropismus und Phototropismus der Wurzel aus (Müller et al., 1998; Wan et al., 2012).

Die abschließend in der Cholodny-Went- und Säure-Wachstums-Hypothese beschriebenen Reaktionen auf Auxin beruhen unter anderem auf Auxin-Response-Faktoren/ARFs. Diese sind in Anwesenheit von Auxin in der Lage an Promotoren mit Auxin-Response-Elementen/AuxRE Auxin-assoziiierter Gene zu binden und so deren Transkription zu initiieren oder zu reprimieren (Guilfoyle et al., 1998). Folglich werden neben vielen anderen Auxin-abhängigen Vorgängen auch Photo- und Gravitropismus über Auxin-Response-Faktoren gesteuert. So besitzt die schon früh beschriebene *nph4*-Mutante eine Mutation im Gen *ARF7* (Harper et al., 2000) und zeigt eine stark verminderte phototrope und gravitrope Reaktion auf (Liscum und Briggs, 1996). Ein Phänotyp, der ebenfalls bei *arf19*-Mutanten auftritt und im Fall einer *arf7arf19*-Doppelmutante in nahezu komplett agravitropen Pflanzen resultiert (Okushima et al., 2005).

1. 6. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war eine mögliche Einordnung des Proteins AGD12 in die Signaltransduktionskette von Gravi- und Phototropismus zu untersuchen. Zudem galt es weitere Faktoren mit Einfluss auf Gravi- und Phototropismus zu beschreiben und damit bestehende Lücken im Verständnis der Signaltransduktion bei Tropismen schließen zu können. Folgende Arbeitsschritte waren dazu geplant:

- Test einer Interaktion von AGD12 und EHB1 mit ARF-Proteinen im Hefe-Zwei-Hybrid-System
- Untersuchung der *AGD*-Expression in Abhängigkeit von Licht
- Etablierung einer *agd12*-Mutante und *AGD12*-Überexpressionslinien
- Gravi- und Phototropismus bei *agd12*-Mutation und *AGD12*-Überexpression
- Einfluss von Saccharose auf Gravitropismus der *agd12*-Mutante
- Einfluss von Calciumionen auf Gravi- und Phototropismus von *agd12*- und *ehb1*-Mutante
- Etablierung von *AGD11*- und *AGD13*-Überexpressionslinien
- Gravi- und Phototropismus bei Überexpression von *AGD11* und *AGD13*
- Lokalisation von *AGD11*, *AGD12* und *AGD13* *in planta*
- *agd12*-Komplementation und Kreuzung von Überexpressionslinien mit *DR5::GUS*-Pflanzen

2. Materialien

2. 1. Organismen

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Organismen

Organismus	Stamm/Linie	Anmerkung/Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101:pMP90 (Koncz et al., 1992, 1994)	für Tabakinfiltration, <i>floral dip</i>
	GV3101:p19 (Win und Kamoun, 2004)	zur Hemmung von PTGS in Tabak
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AH109 (James et al., 1996)	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 : : MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>
	Y2HGold (Nguyen, unpubl.)	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3, GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2 URA3 : : MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA} AUR1-C MEL1</i>
<i>Nicotiana benthamiana</i>		für Tabakinfiltration
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia 0	Wildtyp
	Columbia 3	Wildtyp für <i>ehb1-2</i>
	Columbia 8	Wildtyp für <i>agd12-9</i>
	Columbia Gießen	Wildtyp für MAM08
	<i>ehb1-2</i> (homozygot)	SAIL_385_C07
	<i>agd12-9</i> (homozygot)	SALK_036350C, NASC ID: N662104
	<i>arf7-1 arf19-1</i>	NASC ID: N24629 (Okushima et al., 2005)
	MAM08 (35S::EHB1:GFP)	Expression von EHB1:GFP unter 35S-Kontrolle (Midon, 2006)
	35S::GFP	pBinSMGFP in Columbia 0 (Werner et al., 2003)
	<i>nph3</i>	SALK_122544C, KanR durch pROK2, NASC ID: N682856
	DR5::GUS	Selektion über HygR
	erstellte T-DNA-Insertionslinien	siehe Tabelle 21

2. 2. Oligonukleotide/Primer

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz
CM009	AATATGAGCACCAAGAGTTTC
CM010	AATCTTTTGAAGAACATGAGTC
CM073-11gfp-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGTAACAATGGCTATGTCTCTCGGCCAAGAAAATG
CM074-11gfp-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTGAGTGAGAGGAAGACATTCAA
CM075-12gfp-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGTAACAATGGCTATGAGTTATTCTGGAGCCGGAC
CM076-12gfp-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTGCTCAAGAGGTAGCCACTC
CM077-13gfp-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGTAACAATGGCTATGAGCAATTATGCAGCCGGAC
CM078-13gfp-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTGGTCAAGTGGCAGCCATTC
CM081-gfp11-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATGTCTCTCGGCCAAGAAAATG
CM082-gfp11-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATTGAGTGAGAGGAAGACATTCC
CM083-gfp12-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATGAGTTATTCTGGAGCCGGAC
CM084-gfp12-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATTGCTCAAGAGGTAGCCAC
CM085-gfp13-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATGAGCAATTATGCAGCCGGAC
CM086-gfp13-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATTGGTCAAGTGGCAGCCAT
CM091-agd1ex18fw	TCATTGTATCATCAGCAGGAG
CM092-agd1ex19rev	GCAATCAGTTCGCTATCATTG
CM093-agd2ex18fw	TCGGGGCTGACATAAACATG
CM094-agd2ex19rev	TCTCCATTGCCCTTTCCAAC
CM095-agd3ex18fw	TCAGATTCAAGTGGTCAAACG
CM096-agd3ex19rev	TGACTCTGCAGCAATATCAAG
CM097-agd4ex18fw	ATTGCATATCATCAGGGAACC
CM098-agd4ex19rev	TTTATGCGCACTCGGCTAAG
CM099-agd5ex10fw	ACAACCGCAAGAGAACACTC
CM100-agd5ex11rev	AGATGGTGTGGTGCTTGTTG
CM101-agd6ex3fw	GTTGATGGTCATTACCAAAG
CM102-agd6ex4rev	TATTCAGACCACGATGGTCC
CM103-agd7ex3fw	ATGATTTCTATTATCAGCCTGC
CM104-agd7ex4rev	GGCTCTGCTATTCCTTAATTG
CM105-agd8ex6fw	GTCACGACCAAGATGATTCC
CM106-agd8ex7rev	TGAAGATACCAGAAGCCAAAG
CM107-agd9ex6fw	AGTCTGATCTTTTGGCCAC

Primer	Sequenz
CM108-agd9ex7rev	GCAAATGTTCCCAGCTTATTC
CM109-agd10ex6fw	ATGGAGATTTCCTCTTGATC
CM110-agd10ex7rev	TTCAAACCCATAAGCTGGAAG
CM111-agd11ex9fw	ATCCTGTGTGGAATGAGACG
CM112-agd11ex10rev	CTCGTATGCTTTTGCTGCAC
CM113-agd12ex8fw	TTAAACCCTGTCTGGAATGAG
CM114-agd12ex9rev	CAGATGTAATCAGAGGCTGG
CM115-agd13ex8fw	ATGCTGTCTGTTCTGAGAG
CM116-agd13ex9rev	CCCCAAACATTCTGGATCC
CM117-agd14ex12fw	TGGCTTAGCATACATGGCAG
CM118-agd14ex13rev	TCCAAAGATGAAGCATCTAGG
CM119-agd15ex7fw	AAGAACCACCATAGCACCAC
CM120-agd15ex8rev	CCAACCTTGAGTTCATCATCC
CM121-act1ex4fw	CTCCAAGCAGCATGAAGATC
CM122-act1ex5rev	GAACAATCGATGGACCTGAC
CM123-ubc9ex4fw	TAGGACGAAGGTGTTCCATC
CM124-ubc9ex5rev	GGATCATCTGGGTTTGATC
CM126-eGFPprev	GTTCTGCTGGTAGTGGTCG
CM127-GFP6fw	TCCCACAACGTATACATCATG
CM128-GFP6rev	ATGGTTGTCTGGTAAAAGGAC
CM130-nosTrev	ATATGATAATCATCGCAAGACC
CM131-P35Sfw	TATCCTTCGCAAGACCCTTC
CM140-gus-fw	GTGAACAGGTATGGAATTTTCG
CM141-gus-rev	GGTTTTTCACCGAAGTTCATG
CM142 attB1-agd12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGTTATTCTGGAGCCGGA
CM143 attB2-agd12	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATTGCTCAAGAGGTAGCCAC
CM144 attB1-ehb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGAAAACAGAGGAAGAG
CM145 attB2-ehb1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGAGTCCACTACCACCTG
CM146 attB1-ArfA1c	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGGTTGTCTTCGGAAG
CM147 attB2-ArfA1c	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTATGCCTTGCTTGCATGT
CM148 attB1-ArfA1e	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGTCTATCCTTCGGAAG
CM149 attB2-ArfA1e	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAAGCCTGTTTGCATGTTG
CM150 attB1-ArfB1b	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGTCAAGCTTTTCGTAAG
CM151 attB2-ArfB1b	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAAACGAGTGGCCAACCG

Primer	Sequenz
CM152 attB1-ArlA1d	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGTTTGTGGGATGCTCT
CM153 attB2-ArlA1d	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAATTCGATGATTTGGAGTGC
CM154 attB1-SarA1a	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGTTTTTATTCGATTGGTTCTAT
CM155 attB2-SarA1a	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACTTGATATACTGAGATAGC
CM156 attB1-Arf3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGAATCTTATTCACGCGGA
CM157 attB2-Arf3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTtagccacttcccgaacttcaat
f141	CCACTATCCTTCGCAAGACC
f223	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
f266	TGTAATACGACTCACTATAGGG
TK-11	CTATTCGATGATGAAGATACCCAC
TK-12	GAAGTGAAGTTCGCGGGTTTTTCAG

2. 3. Plasmide/Vektoren

Tabelle 3: Erstellte und verwendete Plasmide

Plasmid	Anmerkung
p19	p19-Expression zur Unterdrückung von PTGS in Tabak (Win und Kamoun, 2004)
pAGD11:GFP	AGD11:GFP-Expressionsvektor
pAGD12:GFP	AGD12:GFP-Expressionsvektor
pAGD13:GFP	AGD13:GFP-Expressionsvektor
pDONR221	Donor-Plasmid für <i>Gateway</i> -Kolonierung
pGADT7	Leervektor mit GAL4-AD für Hefe-Zwei-Hybrid-System (Chien et al., 1991)
pGADT7-AGD12	AD-AGD12 in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGADT7-ARF3	AD-ARF3 in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGADT7-ARFA1C	AD-ARFA1C in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGADT7-ARFB1B	AD-ARFB1B in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGADT7-ARLA1D	AD-ARLA1D in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGADT7-EHB1	AD-EHB1 in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGADT7-GW	Leervektor mit GAL4-AD für Hefe-Zwei-Hybrid-System (Lu et al., 2010)
pGADT7-SARA1A	AD-SARA1A in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGBKT7	Leervektor mit GAL4-BD für Hefe-Zwei-Hybrid-System (Louvét et al., 1997)
pGBKT7-AGD12	BD-AGD12 in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGBKT7-ARF3	BD-ARF3 in Hefe-Zwei-Hybrid-System

Plasmid	Anmerkung
pGBKT7-ARFA1C	BD-ARFA1C in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGBKT7-ARFB1B	BD-ARFB1B in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGBKT7-ARLA1D	BD-ARLA1D in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGBKT7-EHB1	BD-EHB1 in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGBKT7-GW	Leervektor mit GAL4-BD für Hefe-Zwei-Hybrid-System (Lu et al., 2010)
pGBKT7-SARA1A	BD-SARA1A in Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGFP:AGD11	GFP:AGD11-Expressionsvektor
pGFP:AGD12	GFP:AGD12-Expressionsvektor
pGFP:AGD13	GFP:AGD13-Expressionsvektor
pK7FWG2	Leervektor für C-terminale GFP-Fusion (Bhaskar et al., 2009)
pMAM08	EHB1:GFP-Expressionsvektor (Midon, 2006)
pMDC44	Leervektor für N-terminale GFP-Fusion (Curtis und Grossniklaus, 2003)

2. 4. Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs
10x CutSmart Buffer	New England Biolabs
10x Ex Taq Puffer	New England Biolabs
10x NEBuffer 1.1	New England Biolabs
10x NEBuffer 2.1	New England Biolabs
10x NEBuffer 3.1	New England Biolabs
2-(1-Naphthylcarbamoyl)benzoesäure (NPA)	Chemservice
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Roth
4-Nitrophenyl- α -D-Galaktopyranosid (PNP- α -Gal)	Sigma
6x Gel Loading Dye, Blue	New England Biolabs
ABsolute qPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher Scientific
Acetosyringon	Roth
Agarose	Roth

Chemikalie	Hersteller
Ameisensäure	Merck
Ammoniumnitrat	Sigma
Ampicillin	Roth
Aureobasidin A (AbA)	Clontech
Bacto-Agar	Becton, Dickinson and Company
Bacto-Tryptone	Becton, Dickinson and Company
Borsäure	Fluka
Brefeldin A (BFA)	Sigma
Calciumchlorid	Fluka
Calciumoxid	Sigma
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth
Chloralhydrat	Roth
Chloramphenicol	Serva
Chloroform	AppliChem
Cobalt(II)chlorid-Hexahydrat	Sigma
D(+)-Glucose	Roth
D(+)-Saccharose	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
dNTP Mix	Clontech
EDTA-Eisen-Natriumsalz	Sigma
Essigsäure (HAc)	AppliChem
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
flüssiger Stickstoff	Linde
Gentamycin	Roth
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Iod	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Roth

Chemikalie	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Kaliumiodid	Fluka
Kaliumnitrat	Sigma
Kanamycin	Roth
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck
-Leu -Trp Double Dropout Medium (DD-Medium)	Clontech
-Leu -Trp -His -Ade Quadruple Dropout Medium (QD-Medium)	Clontech
-Leu -Trp -His Triple Dropout Medium (TD-Medium)	Clontech
Lithiumacetat (LiAc)	Clontech
Magnesiumchlorid	Sigma
Magnesiumsulfat	Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth
Manganchlorid	Merck
Mangansulfat-Monohydrat	Riedel-de Haën
Midori Green Advance	Nippon Genetics Europe
MS-Salze (Murashige & Skoog M0221)	Duchefa
N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide (FM 4-64)	Life Technologies
Natriumacetat (NaAc)	Riedel-de Haën
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumhypochlorit-Lösung (12%)	Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	Roth
Pepton	Sigma
Phytigel	Sigma
Polyethylenglycol (PEG) 3350	Sigma
Polyethylenglycol (PEG) 8000	Calbiochem
Polyvinylpyrrolidon (PVP) 40000	Roth
Rifampicin	TCI Chemicals
Rinderextrakt	Amresco
Salzsäure	Roth

Chemikalie	Hersteller
Silwet L-77	Helena Chemical
Spectinomycin	Sigma
β-Mercaptoethanol	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma
Triton X-100	Serva
Trypton	Becton, Dickinson and Company
Xylencyanol	AppliChem
Yeastmaker Carrier DNA (10 µg/µl)	Clontech
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck

2. 5. Lösungen und Gemische

Tabelle 5: Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Gemische

Lösung/Gemisch	Zusammensetzung
½ MS-Phytigel	2,165 g/l MS-Salze (M0221) 0,5 g/l MES/NaOH pH 5,8 7 g/l Phytigel optional: 10 g/l Saccharose
1.1xTE/LiAc	110 mM Lithiumacetat 11 mM Tris/HCl pH 8,0 1,1 mM EDTA
6x DNA-Ladepuffer	70 % (v/v) TE-Puffer 30 % (v/v) Glycerin 0,02% (w/v) SDS 0,25 % (w/v) Xylencyanol
Agarose-TBE-Gel	1 % - 2 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer
Alternatives ½ MS-Phytigel mit 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻³ M CaO	85 mg/l (0,625 mM) Kaliumdihydrogenphosphat 950 mg/l (9,4 mM) Kaliumnitrat 185 mg/l (0,75 mM) Magnesiumsulfat-Heptahydrat 825 mg/l (10,3 mM) Ammoniumnitrat 142 mg/l (1,495 mM) Magnesiumchlorid 0,0125 mg/l (0,055 µM) Cobalt(II)chlorid-Hexahydrat 0,0125 mg/l (0,05 µM) Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat 18,35 mg/l (50 µM) EDTA-Eisen-Natriumsalz 3,1 mg/l (50,135 µM) Borsäure 0,415 mg/l (2,5 µM) Kaliumiodid 8,45 mg/l (50 µM) Mangansulfat-Monohydrat 0,125 mg/l (0,515 µM) Natriummolybdat-Dihydrat 4,3 mg/l (14,955 µM) Zinksulfat-Heptahydrat 0,5 g/l MES/ KOH bzw. Ameisensäure pH 5,8 7 g/l Phytigel 0,1 µM CaO bzw. 1 mM CaO

Lösung/Gemisch	Zusammensetzung
AS-Medium	10 mM MES/KOH pH 5,6 10 mM MgCl ₂ 150 µM Acetosyringon
Ca ²⁺ -Minimalmedium mit 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻³ M CaCl ₂	7 g/l Phytigel 0,5 g/l MES/NaOH pH 5,8 0,2 g/l MgCl ₂ 14,7 µg/l (0,1 µM) CaCl ₂ bzw. 147 mg/l (1 mM) CaCl ₂ optional: 10 g/l Saccharose
CTAB-Puffer	2% (w/v) CTAB 100 mM Tris/HCl pH 8,0 20 mM EDTA 1,4 M NaCl 1% (w/v) PVP MW 40000 1% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch beigelegt)
Ethidiumbromid-Bad	0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TBE-Puffer
Infiltrationsmedium	5 % (w/v) Saccharose 0,05 % (v/v) Silwet L-77
Iod-Kaliumiodid-Lösung	6,7 g/l Kaliumiodid 3,3 g/l Iod
Klärlösung	67 % (v/v) Chloralhydrat 22 % (v/v) H ₂ O 11 % (v/v) Glycerin
LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl optional: 15 g/l Bacto-Agar
NPA-Stocklösungen	0,1 mM, 1 mM, 10 mM NPA in DMSO
PEG/LiAc-Lösung	40% (w/v) PEG 3350 100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
PEG/MgCl ₂ -Lösung	30 % (v/v) PEG 8000 30 mM MgCl ₂
SOB-Medium	20 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl/NaOH pH 7,0 10 ml/l 250 mM KCl 5 ml/l 2 M MgCl ₂ (steril filtriert)
SOC-Medium	100 ml SOB-Medium 2 ml 1 M Glucose (steril filtriert)
Sol1	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA 10 ng/ml RNaseA
Sol3	5 M Kaliumacetat 11,5 % (v/v) Essigsäure
Sterilisations-Lösungen	20 % (v/v) 12% Natriumhypochlorit-Lösung 1 % (v/v) Triton X-100

Lösung/Gemisch	Zusammensetzung
TBE-Puffer	10,8 g/l Tris 5,5 g/l Borsäure 4 ml/l 0,5 M EDTA/NaOH pH 8,0
TENS	10 mM Tris 1 mM EDTA 0,1 M NaOH 0,5 % (w/v) SDS
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
TP-Puffer	250 mM KCl/KOH pH 6,7 55 mM MnCl ₂ 15 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES steril filtrieren
Tris-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0
YEB-Medium	0,5 % (w/v) Rinderextrakt 0,1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Saccharose 0,03 % (w/v) MgSO ₄ optional: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar
YPD-Medium	20 g/l Pepton 20 g/l Glucose 10 g/l Hefeextrakt optional: 20 g/l Bacto-Agar
α-Gal-Assay-Puffer	0,33 M Natriumacetat/Essigsäure pH 4,5 10 mg/ml PNP-α-Gal

2. 6. Enzyme

Tabelle 6: Verwendete Enzyme/Restriktionsenzyme

Enzym	Hersteller
BamHI	New England Biolabs
BP Clonase	Thermo Fisher Scientific
BstZ17I	New England Biolabs
EcoRI	New England Biolabs
LR Clonase	Thermo Fisher Scientific
Nrul	New England Biolabs
PvuI	New England Biolabs
RNaseA	Thermo Fisher Scientific
Takara Ex Taq Polymerase	Thermo Fisher Scientific

2. 7. Kommerzielle Kits

Tabelle 7: Verwendete kommerzielle Kits

Kit	Firma
ABsolute qPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher Scientific
Gateway BP Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
LongRange 2Step RT-PCR Kit	QIAGEN
Phire Plant Direct PCR Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN

2. 8. Interferenzfilter

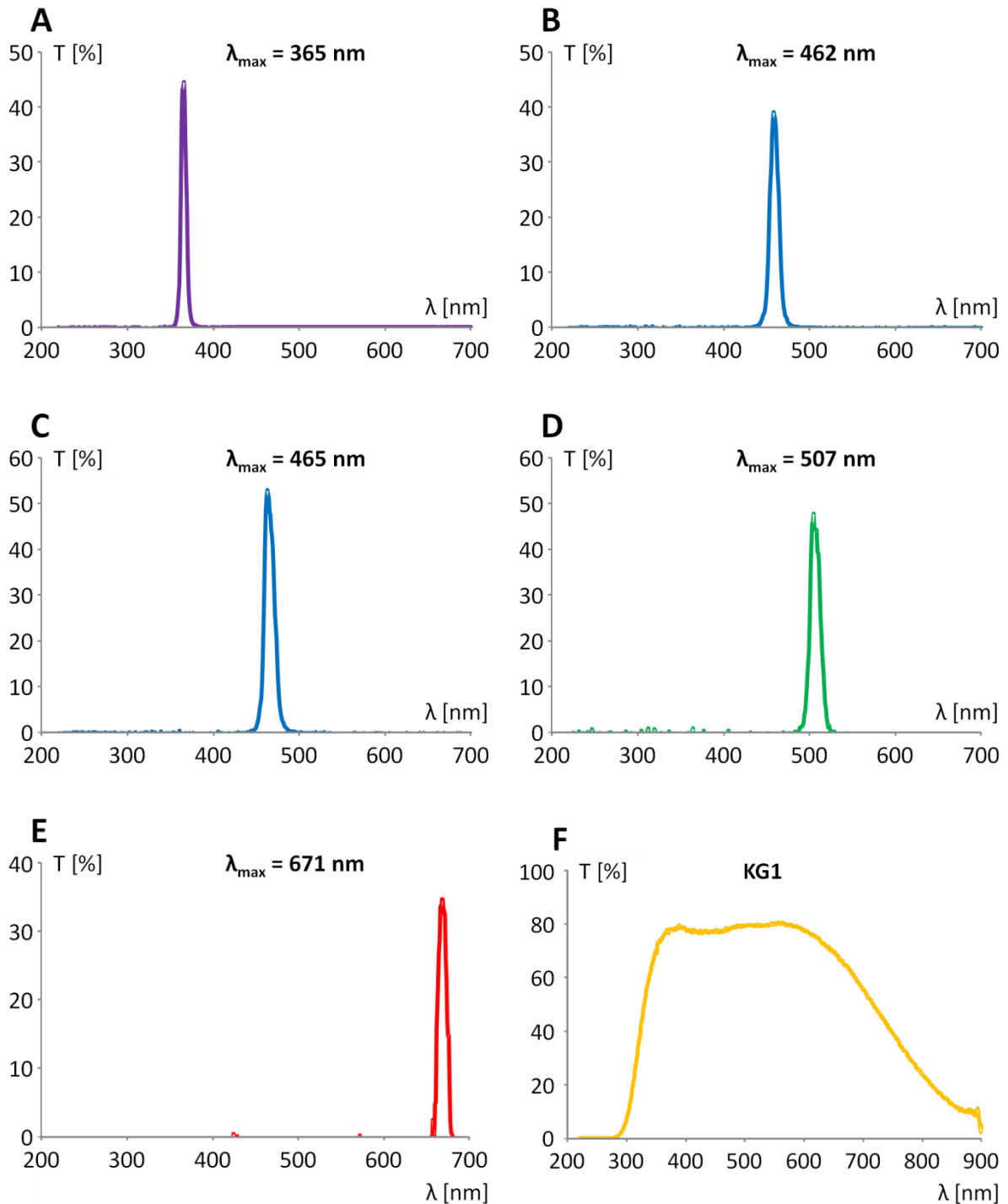


Abbildung 6: Transmissionsspektren verwendeter Interferenz- und Hitzefilter.

Spektrum der Transmission T in % der für die Belichtung von Pflanzen verwendeten Filter, erstellt mittels UV/VIS-Spektrometer. IL-Interferenzfilter mit maximaler Transmission im Bereich von (A) Ultraviolett, (B, C) Blaulicht, (D) Grünlicht, (E) Rotlicht sowie der stets zusätzlich verwendete (F) KG1 Hitzefilter. Hergestellt durch Schott AG.

2. 9. Gerätschaften und Zubehör

Tabelle 8: Verwendete Gerätschaften und Zubehör

Gerät/Zubehör	Firma
96-Well PCR Plates	Biozym
Adhesive Clear PCR Seal	Biozym
Aracons	Arasystem
Brutschrank (29 °C und 37 °C)	Hereaus
Clinostat-Zentrifuge	Eigenbau
Diaprojektor Prado Universal	Ernst Leitz GmbH
Epifluoreszenzmikroskop Olympus BX51	Olympus Deutschland GmbH
Projektionslampe Halogen-Bellaphot 250 W	Osram
Halbspiegel	Schott AG
Konfokalmikroskop TCS SP2	Leica
Konfokalmikroskop TCS SP5	Leica
Kurzpassinterferenzfilter KIF590	Schott AG
Labofuge 400 R mit Swing-out-Rotor	Heraeus
Messkopf BN-9102-4	Gigahertz-Optik
Mini-Sub Cell GT Cell	Biorad
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	Labnet
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Neutralglas	Schott AG
Optometer P-9201	Gigahertz-Optik
pH-Meter	Mettler-Toledo
Prism Air-Cooled Microcentrifuge	Labnet
Schüttler	New Brunswick Scientific
Schwingmühle MM200	Retsch
Spannungsgeber PowerPac Basic	Biorad
Strahlteilerbox (clinostatisiert)	Eigenbau
Strahlteilerbox (statisch)	Eigenbau
Thermoblock BioTDB-100	lab4you
Thermocycler MiniOpticon Real-Time PCR-System	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
UV/VIS Spektrometer UV1202	Shimadzu

Gerät/Zubehör	Firma
UV/VIS Spektrometer UV-2401PC	Shimadzu
UV-Transilluminator UVT-28 ME	Herolab
Vortexer	Heidolph
Wide Mini-Sub Cell GT Cell	Biorad

2. 10. Programme und Websites

Tabelle 9: Verwendete Programme und Websites

Programm/Website	Firma/Webadresse
BAR-Datenbank	bar.utoronto.ca/
BioEdit	mbio.ncsu.edu/bioedit
Bio-Rad CFX Manager 2.0	Bio-Rad
ClustalX	Invitrogen
Double Digest Finder	neb.com
EcoliWiki	ecoliwiki.net
ePlant	bar.utoronto.ca/eplant/
GATC	gatc-biotech.com
ImageJ	imagej.nih.gov/ij/
Imagetool	compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html
IrfanView	irfanview.de
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft Picture Manager	Microsoft
Microsoft Powerpoint	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft
NASC	arabidopsis.info
NCBI Nucleotid BLAST	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
NCBI Protein BLAST	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
OpenWetWare	openwetware.org
Pubmed	ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
SMART	smart.embl-heidelberg.de/
TAIR	arabidopsis.org
Vector NTI	Invitrogen
Zotero	zotero.org

3. Methoden

3. 1. Molekularbiologische Grundtechniken

3. 1. 1. gDNA-Extraktion

Die Extraktion genomischer DNA aus Keimlingen oder Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* erfolgte mittels CTAB-Methode (Doyle und Doyle, 1987). Dazu wurden 50 bis 100 mg frisches Pflanzenmaterial zusammen mit zwei Stahlkügelchen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff überführt. Das folglich gefrorene Pflanzenmaterial wurde daraufhin mittels Stahlkügelchen in einer Zelmühle aufgeschlossen. Danach wurde dem pulverisierten Material 500 µl CTAB-Puffer zugegeben und der Ansatz bei 65 °C für 15 Minuten im Heizblock inkubiert. Daran anschließend wurde das Material ohne Stahlkügelchen in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Nach Zugabe von 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), gefolgt von 1 Minute kräftigem Vortexen, wurde der Ansatz für 10 Minuten mit 13000 g abzentrifugiert. Der Überstand der wässrigen oberen Phase wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Nach wiederholtem Vortexen und Zentrifugation wurde die obere Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene DNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt. Nach daran anschließender Zentrifugation mit 13000 g für 20 Minuten wurde das resultierende DNA-Pellet vom Überstand befreit und mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstands wurde das DNA-Pellet bei 65 °C auf einem Heizblock vom restlichen Ethanol befreit und in 30 µl TE-Puffer gelöst.

Optional wurde das Protokoll um die Zugabe von RNase A ergänzt oder um zusätzliche Chloroform-Extraktionsschritte erweitert. Zudem konnte die DNA-Fällung über Nacht mit eiskaltem Ethanol, anstelle von Isopropanol, vollzogen werden. Die Quantifizierung extrahierter DNA erfolgte mittels Photometer bzw. Nanodrop. Alternativ wurde im Fall der *Phire Plant Direct PCR* eine DNA-Extraktion umgangen und pflanzliches Material direkt in die PCR eingebracht.

3. 1. 2. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis et al., 1986) wurde zum Nachweis von Genen, Transkripten, erfolgreichen Transformationen sowie zum Klonieren verwendet. Dabei wurde zwischen Standard-PCRs mit vorab gewonnener genomischer DNA oder cDNA, direkter PCR mittels *Phire Plant Direct PCR Kit* (Thermo Scientific, 2016) bei dem unbearbeitetes Pflanzenmaterial als Template eingebracht wurde, sowie *Colony-PCR* mit direkter Zugabe von *E. coli* oder *S. cerevisiae* zur Reaktion unterschieden. Im Fall letzterer wurden vorab Klonen von *E. coli* in 10 µl H₂O bzw. *S. cerevisiae* in 10 µl 20 mM NaOH resuspendiert und 1 µl als Template in die PCR eingebracht.

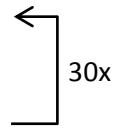
Standard-PCR Zusammensetzung und Programm:

10 µl PCR-Ansatz:

0,05 µl TaKaRa Ex Taq (5 units/µl)
1 µl 10x Ex Taq Puffer
0,8 µl dNTP Mix (je 2,5 mM)
0,05 µl 100 µM Primer 1
0,05 µl 100 µM Primer 2
Template: 5 - 50 ng gDNA; 2 µl cDNA
optional: 0,5 µl DMSO
auf 10 µl mit H₂O auffüllen

PCR-Programm:

2 min 95 °C
15 s 95 °C
30 s 60 °C
60 s/kb 72 °C
5 min 72 °C
∞ 4 °C



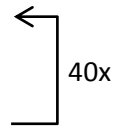
Phire Plant Direct PCR Zusammensetzung und Programm:

10 µl PCR-Ansatz:

4,7 µl H₂O
5 µl 2x Phire Plant PCR Puffer
0,2 µl Phire Hot Start II DNA Polymerase
0,05 µl 100 µM Primer 1
0,05 µl 100 µM Primer 2
Template: 0,5 mm² Blattmaterial; 1 Keimling

PCR-Programm:

5 min 98 °C
5 s 98 °C
5 s 60 °C
20 s 72 °C
1 min 72 °C
∞ 4 °C



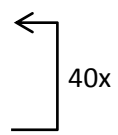
Colony-PCR Zusammensetzung und Programm für *E. coli* und *S. cerevisiae*:

10 µl PCR-Ansatz:

0,1 µl TaKaRa Ex Taq (5 units/µl)
1 µl 10x Ex Taq Puffer
0,8 µl dNTP Mix (je 2,5 mM)
0,1 µl 100 µM Primer 1
0,1 µl 100 µM Primer 2
Template: *E. coli* in 1 µl H₂O ; *S. cerevisiae* in 1 µl 20 mM NaOH
auf 10 µl mit H₂O auffüllen

PCR-Programm:

15 min 99 °C
15 s 95 °C
30 s 56 °C
60 s/kb 72 °C
5 min 72 °C
∞ 4 °C



3. 1. 3. RNA-Extraktion

Die Extraktion von RNA aus Keimlingen oder Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* erfolgte mittels RNeasy Mini Kit. Dazu wurden 100 mg frisches Pflanzenmaterial zusammen mit zwei Stahlkugeln in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff gefroren. Daraufhin wurde das gefrorene Pflanzenmaterial mittels Stahlkugeln in einer Zelmühle aufgeschlossen. Das daraus resultierende pulverisierte Material wurde anschließend mittels Komponenten des RNeasy Mini Kit nach dazugehörigem Protokoll (Qiagen, 2012) behandelt und die dabei extrahierte RNA in 20 µl RNase-freiem H₂O gelöst. Eine abschließende Quantifizierung erfolgte mittels Nanodrop.

3. 1. 4. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wurde zuvor extrahierte RNA als Template eingesetzt und nach Herstellerprotokoll verfahren. Die Reaktionen zur Verifizierung der Mutante *agd12-9* (s. Seite 42) erfolgten dabei unter Einsatz des *LongRange 2Step RT-PCR Kit* entsprechend der beigefügten Gebrauchsanweisung (Qiagen, 2010). Reverse Transkription im Vorfeld quantitativer PCRs (s. Seite 45 bis 48) sowie zur Erstellung von Expressionsvektoren (s. Seite 49 und 58) wurden mittels *QuantiTect Reverse Transcription Kit* anhand des dazugehörigen Protokolls durchgeführt (Qiagen, 2009).

3. 1. 5. Verifizierung der Mutante *agd12-9*

Zum Erlangen einer *agd12*-Mutante in *A. thaliana* wurden diverse T-DNA-Insertionslinien hinsichtlich einer Insertion in das Gen *AGD12* (AT4G21160) vorab mittels *online* verfügbarer Sequenzierungsdaten in TAIR und NASC ausgewählt. Folglich wurden Linien mit nur einer T-DNA-Insertion im Genom bzw. im proteincodierenden Bereich von *AGD12* mittels PCR analysiert. Dabei handelte es sich um die SALK-Linien SALK_036350 (NASC ID: N536350) mit putativ heterozygoter *agd12*-Mutation sowie die davon abstammende putativ homozygote *agd12*-Mutante SALK_036350C (NASC ID: N662104). Im Fall beider Linien stellte Columbia 8 (NASC ID: N60000) den dazugehörigen isogenen Wildtyp dar.

Anhand der verfügbaren Sequenzierungsdaten konnte die potentielle Position einer T-DNA-Insertion mittels Vector NTI abgebildet werden (Abb. 19A und B). Die zur Genotypisierung durchgeführten PCRs beinhalteten die Primer CM09/CM10 gegen das *AGD12*-Wildtypgen, mit einem erwarteten Amplifikat von 1186 bp Länge (Abb. 19C), sowie die Primer CM09/f141 gegen die linke Seite der T-DNA-Insertion im *AGD12*-Gen, mit einem erwarteten Amplifikat von 1962 bp Länge (Abb. 19D). Die als Template verwendete genomische DNA der zu untersuchenden Pflanzen wurde mittels CTAB-basierter gDNA-Extraktion isoliert. Eine Kontrolle der verwendeten genomischen DNA erfolgte über die Amplifikation des *HO1*-Gens (AT2G26670) durch die Primer Üff1/Üff2, mit einem erwarteten Produkt von 1557 bp Länge.

Zum Nachweis einer unvollständigen Transkription von *AGD12* wurde RNA aus den zu untersuchenden Pflanzen mittels RNeasy Mini Kit isoliert (Qiagen, 2012). Die anschließende reverse Transkription

aus mRNA erfolgte durch *LongRange 2Step RT-PCR Kit* (Qiagen, 2010). Die daraus resultierende cDNA diente als Template für PCRs mit den Primern CM09/CM10 gegen die codierende Sequenz von *AGD12* und einem erwarteten Produkt von 848 bp Länge. Die Kontrolle der eingesetzten cDNA erfolgte über eine PCR mit den Primern CM19/CM20 gegen die codierende Sequenz von *AGD11* und einem erwarteten Produkt von 1144 bp Länge. Resultate aller PCRs wurden auf 1% Agarose-TBE-Gele aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV-Transilluminator und Kamera dokumentiert (Abb. 19). Die damit verifizierte *agd12*-Mutante wurde im Zuge anschließender Versuche als Mutante *agd12-9* bezeichnet.

3. 1. 6. Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA diente der Klonierung sowie der Analyse bzw. Kontrolle erfolgter Klonierungsschritte. Dafür wurden NEB-Restriktionsenzyme und NEB-Puffer anhand dazu empfohlener Reaktionsbedingungen verwendet (New England Biolabs, 2017a). Im Fall von Mehrfach-Restriktionen wurden die Reaktionsbedingungen mittels *Double Digest Finder* ermittelt (New England Biolabs, 2017b). Nach Abschluss einer Restriktion wurden die verwendeten Enzyme durch 20 Minuten Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

3. 1. 7. DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse einer PCR, Restriktion, Aufreinigung oder Extraktion von DNA wurden Nukleinsäuren gelelektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde den Proben im Vorfeld 6xDNA-Ladepuffer zugegeben. So präparierte Proben wurden auf TBE-Agarose-Gele mit 1 % bis 2 % Agarose geladen. Zusätzlich wurde ein 1 kb oder 100 bp DNA Ladder zur Größenbestimmung aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem mit TBE-Puffer gefülltem *Wide Mini-Sub Cell GT Cell* bzw. *Mini-Sub Cell GT Cell* eine Spannung von 120 V für 60 Minuten. Die Gelfärbung erfolgte anschließend mittels 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Bad oder durch vorheriges Applizieren von 1 µl/ml *Midori Green Advance* in das noch nicht gegossene TBE-Agarose-Gel. Das Fluoreszenzsignal derart markierter DNA wurde mittels UV-Transilluminator mit $\lambda_{\text{max}} = 312 \text{ nm}$ angeregt und per Kamera dokumentiert.

3. 1. 8. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte nach Inoue et al., 1990 mit einigen Abänderungen hinsichtlich verwendeter Volumina. So wurden Bakterien eines -80 °C Stocks des Stamms DH5α auf LB-Platten ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den so gewachsenen Kolonien wurde 250 ml SOB-Medium beimpft und die Anzucht für 1 bis 2 Tage bei 18 °C bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von über 0,5 mit 250 rpm geschüttelt. Je 40 ml der Bakterienkultur wurde in zwei vorgekühlte 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten auf Eis inkubiert,

um anschließend für 10 Minuten bei 4 °C mit 2500 g abzentrifugiert zu werden. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Pellets in je 13 ml TP-Puffer resuspendiert und erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert, um anschließend für 10 Minuten bei 4 °C mit 2500 g abzentrifugiert zu werden. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Pellets in je 3 ml TP-Puffer resuspendiert und beide Bakterien-Suspensionen vereint. Anschließend wurde bei leichtem Schwenken 420 µl DMSO auf eine Endkonzentration von 7 % zugegeben, die Suspension in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigen Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3. 1. 9. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte ebenfalls nach Inoue et al., 1990. So wurden chemisch kompetente Zellen des Stamms DH5α für 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden mit leichtem Rühren 1 bis 5 µl Ligationsansatz, 5 µl Clonase-Reaktion oder 10 ng Plasmid-DNA zugegeben und die Zellen für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 Sekunden in einem 42 °C Wasserbad erhitzt, anschließend für 2 Minuten in Eiswasser gekühlt und dem Transformationsansatz 200 µl SOC-Medium zugegeben. Nach darauf folgendem Schütteln des Ansatzes mit 250 rpm bei 37 °C für 60 Minuten wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika, d.h. 50 µg/ml Ampicillin, Kanamycin oder Spectinomycin, ausgebracht und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Resultierende Klone bzw. Kolonien dienten als Ausgangsmaterial für Colony-PCR und Plasmid-Minipräparation.

3. 1. 10. Plasmid-Minipräparation aus *E. coli*

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* basierte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dazu wurde im Vorfeld der Extraktion 1,5 ml LB-Medium inklusive entsprechendem Antibiotikum mit *E. coli*-Zellen beimpft, die das zu extrahierende Plasmid enthielten. Die Kultur wurde daraufhin bei 37 °C über Nacht mit 250 rpm geschüttelt und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltenen Zellen wurden 10 Sekunden lang mit 12000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Sol1 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation mit 13000 g für 10 Sekunden wurde der Überstand bis auf 50 µl verworfen und das Zellpellet durch starkes Vortexen homogenisiert. Anschließend wurden 300 µl frisch angesetztes TENS zugegeben, das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Neutralisieren der Lösung wurde dem Ansatz 150 µl Sol3 zugegeben, das Reaktionsgefäß erneut mehrmals invertiert und unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation mit 12000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde komplett in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl 24:1 Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, 30 Sekunden stark gevortext und 10 Minuten lang mit 13000 g zentrifugiert. Daran anschließend wurde die obere wässrige Phase der Chloroform-Extraktion entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt. Danach wurde die DNA durch 10 Minuten Zentrifugation mit 13000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das entstandene DNA-Pellet mittels 65 °C Heizblock getrocknet und durch Zugabe von 20 µl bis 50 µl H₂O, TE-Puffer oder Tris-Puffer gelöst.

Alternativ wurde Plasmid-DNA mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* aus *E. coli*, dem Benutzerprotokoll entsprechend, extrahiert (Qiagen, 2015). Die anschließende DNA-Quantifizierung erfolgte über UV/VIS-Spektrometer oder NanoDrop.

3. 1. 11. Gateway-Klonierung

Für eine gezielte Expression von Genen in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* und *Saccharomyces cerevisiae* wurden diese Organismen mittels Expressionsvektoren transformiert. Im Vorfeld wurden entsprechende Gene über das Verfahren der *Gateway*-Klonierung in Plasmide eingebracht. Dabei wurde ein mit *attB*-Überhängen amplifizierte CDS in einen *Entry*-Vektor kloniert. In einer zweiten Reaktion wurde die CDS aus dem *Entry*- in einen *Destination*-Vektor übertragen, welcher daraufhin als Expressionsvektor bezeichnet wird (Invitrogen, 2003).

Der erste Schritt, die Amplifikation der codierenden Sequenz von Genen, erfolgte mittels *forward*- und *reverse*-Primern, die mit speziellen *attB*-Überhängen konstruiert wurden. Das PCR-Template stellte cDNA des Wildtyps Columbia 0 dar. Die PCR erfolgte nach dem Standard-Programm (s. Seite 40). Die daran anschließende Aufreinigung des PCR-Produkts mittels PEG/MgCl₂-Lösung sowie BP-Clonase-Reaktion erfolgte mittels Gateway BP Clonase II Enzyme Mix und dazugehörigem Protokoll (Invitrogen, 2010). Dabei bildete der Donor-Vektor pDONR221 das Grundgerüst für daraus resultierende *Entry*-Vektoren.

Erfolgreich klonierte *Entry*-Vektoren wurden über *E. coli* mittels Kanamycin, *Colony*-PCR und Restriktionsanalyse verifiziert. Nach anschließender Linearisierung über die Restriktionsenzyme *NruI* bzw. *PvuI* wurden codierende Sequenzen aus den *Entry*-Vektoren mittels Gateway LR Clonase II Enzyme Mix anhand des dazugehörigen Protokolls in einen *Destination*-Vektor übertragen (Invitrogen, 2015). Daraus resultierende Expressionsvektoren wurden über *E. coli* mittels Kanamycin bzw. Ampicillin, *Colony*-PCR und einer Sequenzierung verifiziert (Tabelle 18, Abb. 39 und Abb. 40).

3. 1. 12. Pflanzenanzucht für quantitative PCR

Zur Quantifizierung der *AGD*-Expression in *Arabidopsis thaliana*, bei verschiedenen Lichtqualitäten und Fluenzraten, kam die Methode der quantitativen PCR zum Einsatz. Im Vorfeld wurden dafür Samen des Wildtyps Columbia 8 oberflächensterilisiert und nach Brechen der Samenruhe für 4 Tage bei unterschiedlichen Lichtbedingungen angezogen (Tabelle 10). Hierzu wurden Diaprojektoren mit einer 250 W Halogen-Projektionslampe verwendet. Das so erzeugte Weißlicht wurde durch einen KG1-Hitzefilter und IL-Interferenzfilter geleitet (Abb. 6). Nach Abschluss der Belichtung wurde die RNA aller Keimlinge isoliert, um daraus ein cDNA-*Template* für quantitative PCRs zu erstellen.

Tabelle 10: Belichtungsprogramm zur Quantifizierung der AGD-Genexpression

Belichtung	Proben-Abkürzung	IL-Filter λ_{\max} [nm]	Fluenzrate [$\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$]
Dunkelheit	D	-	-
Ultraviolett	U	365	0,1
Blaulicht, hoch	Bh	462	10
Blaulicht, mittel	Bm	462	0,1
Blaulicht, schwach	Bs	462	0,001
Grünlicht	G	507	0,1
Rotlicht	R	671	0,1

3. 1. 13. Effizienzbestimmung für quantitative PCR

Im Vorfeld der Quantifizierung wurden Primer für die entsprechenden Gene *AGD1* bis *AGD15* sowie die Referenzgene *ACT1* und *UBC9* konstruiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass jeweils *forward*-Primer im vorletzten und *reverse*-Primer im letzten Exon eines Gens binden. Derart konstruierte *intron-overspanning* Primer erlaubten nach Abschluss einer PCR eine unerwünschte Amplifikation genomischer DNA von der der cDNA zu unterscheiden. Zudem wurden alle Primer bezüglich des resultierenden PCR-Produkts bzw. Amplicon im Größenbereich um 150 bp konstruiert. Alle PCRs wurden im Vorfeld hinsichtlich *Annealing*-Zeit und Primerkonzentration optimiert und auf eventuelle unspezifische PCR-Produkte bzw. Primer-Dimere getestet.

Des Weiteren wurde für jede Primer-Kombination eine Standardkurve zur Effizienzbestimmung erstellt. Dazu wurden cDNA-Templates verschiedener Konzentrationen erstellt. Dabei war eine korrekte cDNA-Quantifizierung aus der Reaktion der reversen Transkription heraus, nicht möglich. Demnach wurde die zuvor eingesetzte RNA-Konzentration (RNA*) als Maßstab für die eingebrachte Template-Konzentration verwendet. So wurde der ursprüngliche Ansatz der reversen Transkription mit einer Konzentration von 50 ng/ μl RNA* auf 10 ng/ μg , 1 ng/ μg und 0,1 ng/ μg RNA* verdünnt und als Template in qPCR-Triplicate mit je 25; 2,5 und 0,25 ng RNA* eingesetzt. Zusätzlich wurden Negativkontrollen ohne Template (NTC) sowie ohne Reverse Transkriptase (NRT) erstellt. Zudem wurden mögliche unspezifischer PCR-Produkte mittels Schmelzkurven-Analyse und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Ansätze ausgeschlossen.

Die daraus resultierenden Ct-Werte, in Abhängigkeit zur eingesetzten Template-Menge, bildeten die Grundlage einer Standardkurve für jedes verwendete Primer-Paar. Damit gaben diese Ct-Werte Aufschluss über die Effizienz E der PCR sowie die Linearität R^2 der resultierenden Standardkurve. Um eine korrekte Quantifizierung der AGD-Expression zu gewährleisten, sollte die ermittelte Effizienz E im Bereich von 85 % bis 115 % liegen und die Linearität $R^2 \geq 0,98$ entsprechen (Tabelle 11).

Quantitative PCR: Zusammensetzung und Programm

25 µl PCR-Ansatz:

12,5 µl ABsolute qPCR SYBR Green Mix
 5 µl 1 µM Primer 1
 5 µl 1 µM Primer 2
 2,5 µl cDNA (\cong 25; 2,5; 0,25 ng RNA*)

PCR-Programm:

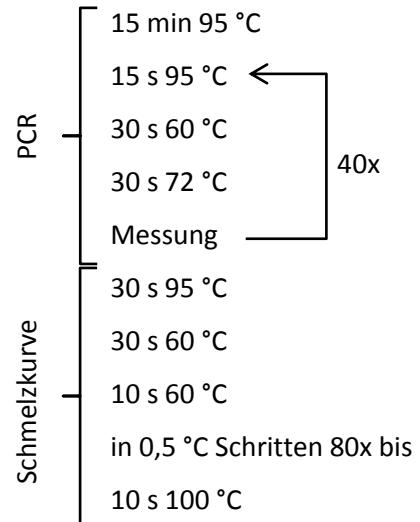


Tabelle 11: Effizienz und Linearität quantitativer PCRs

Gen	Primer	cDNA (gDNA) Amplicon in bp	E in %	R ²
AGD1 (AT5G61980)	CM91/CM92	141 (237)	99,7	0,984
AGD2 (AT1G60860)	CM93/CM94	162 (239)	104	0,993
AGD3 (AT5G13300)	CM95/CM96	144 (253)	98	0,997
AGD4 (AT1G10870)	CM97/CM98	165 (371)	100,8	0,971
AGD5 (AT5G54310)	CM99/CM100	145 (258)	100,1	0,998
AGD6 (AT3G53710)	CM101/CM102	160 (236)	93,6	0,995
AGD7 (AT2G37550)	CM103/CM104	147 (228)	94,7	0,997
AGD8 (AT4G17890)	CM105/CM106	150 (221)	75	0,989
AGD9 (AT5G46750)	CM107/CM108	152 (243)	99,9	0,997
AGD10 (AT2G35210)	CM109/CM110	147 (238)	113,7	0,989
AGD11 (AT3G07940)	CM111/CM112	158 (233)	100,1	0,996
AGD12 (AT4G21160)	CM113/CM114	148 (238)	86,4	0,99
AGD13 (AT4G05330)	CM115/CM116	154 (239)	105	0,989
AGD14 (AT1G08680)	CM117/CM118	147 (386)	90,5	0,995
AGD15 (AT3G17660)	CM119/CM120	164 (246)	96,9	0,984
ACT1 (AT2G37620)	CM121/CM122	150 (261)	94,7	0,991
UBC9 (AT4G27960)	CM123/CM124	147 (240)	104,3	0,994

3. 1. 14. Quantifizierung von AGD-Expression

Zur Quantifizierung der Genexpression von *AGD1* bis *AGD15* wurden cDNA von unter verschiedenen Lichtbedingungen gewachsenen Keimlingen auf 1 ng/μl RNA* verdünnt und pro 25 μl PCR-Ansatz jeweils 2,5 ng RNA* als Template eingesetzt. Entsprechend der MIQE-Guidelines wurden Triplikate für jede zu untersuchende Lichtbedingung (D, U, Bh, Bm, Bs, G, R und Negativkontrollen) ohne Template (NTC) erstellt (Bustin et al., 2009). Der anschließende Ablauf der PCR mittels MiniOpticon™ Real-Time PCR-Cycler und Bio-Rad CFX Manager 2.0 entsprach den Reaktionen zur Berechnung der PCR-Effizienz (s. Seite 47).

Die daraus resultierenden Ct-Werte für *AGD*-Gene sowie Referenzgene *ACT1* und *UBC9* wurden anschließend zur Berechnung der *fold change* ($2^{-\Delta Ct}$) der *AGD*-Expression sowie der relativen *fold change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der *AGD*-Expression in Relation zur Expression eines Referenzgens verwendet. Als Referenzgen diente hierbei *UBC9*, da *ACT1* stärkere Schwankungen hinsichtlich seiner eigenen Expression zeigte (Abb. 16). Zudem wurde die Genexpression von Proben in Dunkelheit als unbehandelte Proben gesetzt und bildete somit den 100%-Richtwert, an dem sich alle Genexpressionen belichteter bzw. behandelter Proben orientierten. Daran anschließend wurden die Werte für *fold change* (Formel 1) sowie relative *fold change* (Formel 2) in Prozent ermittelt (Schmittgen und Livak, 2008). Die daraus resultierenden Einzelwerte der Triplikate wurden abschließend zu Mittelwerten mit Standardfehlern zusammengefügt und mittels Microsoft Excel grafisch dargestellt (Abb. 16 und Abb. 17).

Formel 1: *fold change* in % = $(2^{-Ct(\text{Licht})} / 2^{-Ct(\text{Dunkel})}) \cdot 100$

Formel 2: relative *fold change* in % = $100 \cdot 2^{-((Ct(AGD\text{-Licht}) - Ct(UBC9\text{-Licht})) - (Ct(AGD\text{-Dunkel}) - Ct(UBC9\text{-Dunkel})))}$

3. 1. 15. Analyse von Nukleotid- und Protein-Sequenzen

Zur Analyse von Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden Sequenzen aus Sequenzierungen sowie den Datenbanken von NCBI und TAIR verwendet. Vergleichende Analysen der Sequenzen bzw. Alignments erfolgten über den ClustalX Algorithmus in Vector NTI und NCBI BLAST-Analysen. Untersuchungen zur Phylogenie der AGD- und ARF-Proteine erfolgten mittels Vector NTI (Abb. 12 und Abb. 15). Die Identifikation von Proteindomänen erfolgte mittels NCBI BLAST und SMART. Analysen zu Promotorelementen bei *AGD11* (AT3G07940), *AGD12* (AT4G21160), *AGD13* (AT4G05330) und *EHF1* (AT1G70800), hinsichtlich eines Einflusses von Saccharose und Phytochrom auf deren Expression, erfolgte mittels Vector NTI anhand bekannter DNA-Motive für Zucker-gesteuerte Transkription sowie PIF-bindende DNA-Motive (Tabelle 12). Die dabei untersuchte Sequenz von je 2000 bp oberhalb des Transkriptionsstarts betreffender Gene wurde den Sequenzen der kompletten Chromosomen 1, 3 und 4 von *Arabidopsis thaliana* entnommen (Abb. 18).

Tabelle 12: Promotorelemente mit Assoziation zu Zucker und Phytochrom

Motiv	Sequenz	Referenz
G-Box(PIF)	CACGTG	(Zhang et al., 2013)
G-Box(Sugar)	TACGTG	(Lu et al., 1998)
PBE-Box	CACATG	(Leivar und Monte, 2014)
S3S1	AAATCA(N) _x ATAGAAA	(Çakir et al., 2003)
SURE1	AATAGAAAA	(Grierson et al., 1994)
TATCCA	TATCCA	(Lu et al., 1998)
TEF	CATAAT	(Li et al., 2006)

3. 1. 16. Klonierung der AGD-Expressionsvektoren

Die Klonierung der Gene *AGD11*, *AGD12* und *AGD13* in Expressionsvektoren diente der späteren Expression von GFP-Fusionsproteinen in *Nicotiana benthamiana* und *Arabidopsis thaliana*, um Informationen über deren Lokalisation und Funktion zu erlangen. Dazu wurde im Vorfeld RNA aus Pflanzen des Wildtyps Columbia 0 mittels *RNeasy Mini Kit* isoliert. Die anschließende reverse Transkription erfolgte mittels *LongRange 2Step RT-PCR Kit*. Die so gewonnene cDNA diente als Template der Amplifikation der codierenden Sequenz von *AGD11* (AT3G07940.1), *AGD12* (AT4G21160.1) und *AGD13* (AT4G05330.1). Dabei wurden, abhängig von Gen sowie späterer Orientierung der codierenden Sequenz, spezifische Primer verwendet, die sowohl *AGD*-Sequenzen als auch *attB*-Überhänge zur späteren *Gateway*-Klonierung enthielten. So wurden, in Fall späterer Fusionsproteine mit C-terminalem GFP, *forward*-Primer mit einer zusätzlichen pflanzenspezifischen Kozak-Sequenz vor dem Start-ATG versehen (Lütcke et al., 1987). Zudem wurden bei den dazugehörigen *reverse*-Primern die Basen für das abschließende STOP-Codon entfernt, um eine störungsfreie Translation inklusive GFP-Sequenz zu gewährleisten. Im Fall späterer Fusionsproteine mit N-terminalem GFP enthielten *reverse*-Primer die Basen des natürlichen STOP-Codons. Dazugehörige *forward*-Primer enthielten dagegen keine Kozak-Sequenz (Tabelle 13).

Tabelle 13: Angestrebte GFP-Fusionen und dazu verwendete Primer mit attB-Überhängen

Übersicht der zu klonierenden GFP-Fusionskonstrukte mit dazu notwendigen (fw) *forward*- und (rev) *reverse*-Primern mit (gelb) attB-Überhängen, (blau) Kozak-Sequenz, (grün) codierender Sequenz und (rot) Stop-Codon.

GFP-Fusion	Primer-Name	Sequenz
AGD11:GFP	CM73-11gfp-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTAAACAATGGCTATGTCTCTCGGCCAAGAAAATG
	CM74-11gfp-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGAGTGAGAGGAAGACATTCAA
AGD12:GFP	CM75-12gfp-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTAAACAATGGCTATGAGTTATTCTGGAGCCGGAC
	CM76-12gfp-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGCTCAAGAGGTAGCCACTC
AGD13:GFP	CM77-13gfp-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTAAACAATGGCTATGAGCAATTATGCAGCCGGAC
	CM78-13gfp-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGGTCAAGTGGCAGCCATTG
GFP:AGD11	CM81-gfp11-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTCTCTCGGCCAAGAAAATG
	CM82-gfp11-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATTGAGTGAGAGGAAGACATTG
GFP:AGD12	CM83-gfp12-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAGTTATTCTGGAGCCGGAC
	CM84-gfp12-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATTGCTCAAGAGGTAGCCACT
GFP:AGD13	CM85-gfp13-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAGCAATTATGCAGCCGGAC
	CM86-gfp13-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATTGCTCAAGTGGCAGCCAT

Die anschließenden PCRs erfolgten nach Standard-Protokoll (s. Seite 41). Die Amplifikationsprodukte wurden mittels PEG/MgCl₂-Lösung gereinigt und durch *Gateway*-Klonierung (s. Seite 45) in den Donor-Vektor pDONR221 und aus diesem anschließend in die *Destination*- bzw. Leervektoren pK7FWG2 (Bhaskar et al., 2009) und pMDC44 (Curtis und Grossniklaus, 2003) eingebracht. So resultierten aus der LR-Reaktion mit pK7FWG2 die späteren Expressionsvektoren pAGD11:GFP, pAGD12:GFP, pAGD13:GFP. Im Fall von pMDC44 entstanden die Expressionsvektoren pGFP:AGD11, pGFP:AGD12, pGFP:AGD13. Diese wurden zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* verwendet (s. Seite 51), um die darin enthaltenen T-DNA-Konstrukte transient in *Nicotiana benthamiana* (s. Seite 51) sowie stabil in *Arabidopsis thaliana* (s. Seite 52) einzubringen.

3. 1. 17. Herstellung kompetenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* (Wang, 2006) wurden Bakterien des Stamms GV3101:pMP90 (Koncz et al., 1992, 1994) auf YEB-Platten mit 100 µg/ml Rifampicin sowie 40 µg/ml Gentamycin ausplattiert und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Resultierende Einzelkolonien wurden anschließend in 20 ml YEB-Medium mit Rifampicin sowie Gentamycin überführt und bei 28 °C über Nacht mit 250 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurde mit dieser Kultur 100 ml YEB-Medium mit Rifampicin und Gentamycin auf eine Bakteriendichte bzw. OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und 6 Stunden bei 28 °C mit 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 geschüttelt. Anschließend wurden 50 ml der Bakterien-Kultur 10 Minuten lang mit 5000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml 0,15 M NaCl₂ resuspendiert, die Bakterien erneut 10 Minuten lang bei 5000 rpm abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands das Pellet in 2 ml eiskalter 20 mM

CaCl₂-Lösung resuspendiert. Daraus resultierende chemisch kompetente Zellen wurden als 100 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -70 °C gelagert.

3. 1. 18. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte nach Wang, 2006. Dazu wurden chemisch kompetenter Zellen des Stamms GV3101:pMP90 (Koncz et al., 1992, 1994) 2 Stunden lang auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde den Zellen je 5 µg des gewünschten Expressionsvektor zugegeben und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Transformationsansätze für 5 Minuten in flüssigen Stickstoff gefroren, 5 Minuten in 37 °C Wasserbad erhitzt, 1 ml YEB-Medium zugegeben und 2 Stunden lang bei 28 °C mit 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen 3 Minuten mit 4000 rpm abzentrifugiert und auf YEB-Platten mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin sowie einem durch den Expressionsvektor bedingten Antibiotikum ausplattiert. Folglich wurde den YEB-Platten im Fall der Expressionsvektoren pAGD11:GFP, pAGD12:GFP, pAGD13:GFP 50 µg/ml Spectinomycin zugegeben. Bei den Expressionsvektoren pGFP:AGD11, pGFP:AGD12, pGFP:AGD13 wurde den Platten 50 µg/ml Kanamycin beigelegt. Abschließend wurden die Transformationsplatten für 2 Tage bei 28 °C inkubiert und entstehende Kolonien bzw. Klone durch eine Extraktion der Plasmide und anschließender analytischer Restriktion auf korrekte Transformation getestet. Dafür wurden zu untersuchende Klone über Nacht in je 2 ml YEB mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin sowie 50 µg/ml Spectinomycin oder Kanamycin angezogen. Expressionsvektoren wurden aus je 1,5 ml dieser Übernachtskultur durch Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse extrahiert (s. Seite 44). Danach wurden 2 µl gelöster Plasmid-DNA zur Transformation von kompetenten DH5α *E. coli* verwendet. Expressionsvektoren wurden anschließend mittels Alkalischer Lyse aus *E. coli* extrahiert und anhand einer Restriktion mit BamHI und BstZ17I verifiziert. Erfolgreich transformierte Klone von *Agrobacterium tumefaciens* wurden in Flüssigkultur mit 7 % DMSO versehen und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3. 1. 19. Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Die transiente Transformation der Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* erfolgte nach Romeis et al., 2001. Dazu wurden mit Expressionsvektoren transformierte Agrobakterien des Stamms GV3101:pMP90 (Koncz et al., 1992, 1994) in je 3 ml YEB-Medium mit 50 µg/ml Rifampicin, 20 µg/ml Gentamycin sowie 25 µg/ml Spectinomycin oder Kanamycin überführt und über Nacht bei 28 °C mit 200 rpm geschüttelt. Je 1 ml der Anzucht wurde in 4 ml YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und für weitere 4 Stunden bei 28 °C mit 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien mit 4000 rpm bei 4 °C 15 Minuten lang abzentrifugiert, nach Verwerfen des Überstands in je 1 ml AS-Medium resuspendiert und auf eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,8 verdünnt.

Um späteres posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS) zu unterbinden, wurden zusätzlich Agrobakterien des Stamms GV3101:p19 (Win und Kamoun, 2004) verwendet. Diese wurden in YEB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Kanamycin angezogen und ebenfalls in AS-Medium auf eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,8 verdünnt. So diente der darüber eingebrachte

p19-Vektor der zusätzlichen Synthese des p19-Proteins des Tomatenzwergbusch-Virus (*Tomato Bushy Stunt Virus*, TBSV). Dabei fungierte p19 als Suppressor für posttranskriptionelles Gen-Silencing und erhöhte somit die Ausbeute an GFP-Fusionsproteinen (Voinnet et al., 2003).

Die so präparierten Suspensionen der jeweiligen GV3101:pMP90-Expressionsstämme sowie des GV3101:p19-Suppressions-Stamms wurden im Verhältnis von 1:1 gemischt und mittels einer Spritze in die Blattunterseite von ca. 4 Wochen alten Tabakpflanzen infiltriert. Anschließend wurden die Pflanzen bei hoher Luftfeuchtigkeit und schwachem Weißlicht bei 25 °C inkubiert. Die Expression und Lokalisation der GFP-Fusionsproteine wurde 3 bis 5 Tage nach der Infiltration mittels Epifluoreszenz und durch Einsatz von Konfokalmikroskopie dokumentiert.

3. 1. 20. Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *floral dip*

Die Erstellung transgener Linien durch stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte durch die *floral dip*-Methode (Clough und Bent, 1998; Desfeux et al., 2000). Dazu wurden Pflanzen des Wildtyps Columbia 8 unter Langtagbedingung mit über 12 Stunden Sonnenlicht pro Tag bis zur Blütenbildung herangezogen. In Folge dessen wurden je 5 ml YEB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin sowie 50 µg/ml Spectinomycin bzw. Kanamycin mit transformierten Agrobakterien beimpft. Diese wurden über Nacht bei 28 °C mit 250 rpm geschüttelt und anschließend in eine Kultur mit 50 ml YEB-Medium überführt. Anschließend wurde die Kultur für 8 Stunden bei 28 °C mit 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 geschüttelt. Die so vermehrten Zellen wurden anschließend 20 Minuten lang mit 5500 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in Infiltrationsmedium resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,8 eingestellt.

Anschließend wurden ungeöffnete Blütenknospen der angezogenen Pflanzen für mindestens 10 Sekunden in Infiltrationsmedium mit Agrobakterien geschwenkt. Danach wurden die Pflanzen für 2 Tage in Eimern mit Frischhaltefolie gegen Austrocknung und mit halbdurchlässigem Papier gegen Lichteinfall bei 25 °C gelagert. Die so behandelten Pflanzen der T0-Generation wurden bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen verwahrt. Die von diesen T0-Pflanzen geernteten Samen entsprachen folglich der Generation T1 und waren im Fall erfolgreicher Transformation in Bezug auf das durch *Agrobacterium tumefaciens* inserierte DNA-Konstrukt heterozygot (Abb. 8).

3. 1. 21. Selektion und Zucht nach T-DNA-Insertion in *Arabidopsis thaliana*

Nach ihrer Ernte wurden Samen der T1-Generation für mindestens 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden oberflächensterilisierte T1-Samen auf ½ MS-Phytigel mit Antibiotikum übertragen und nach Harrison et al., 2006 selektioniert.

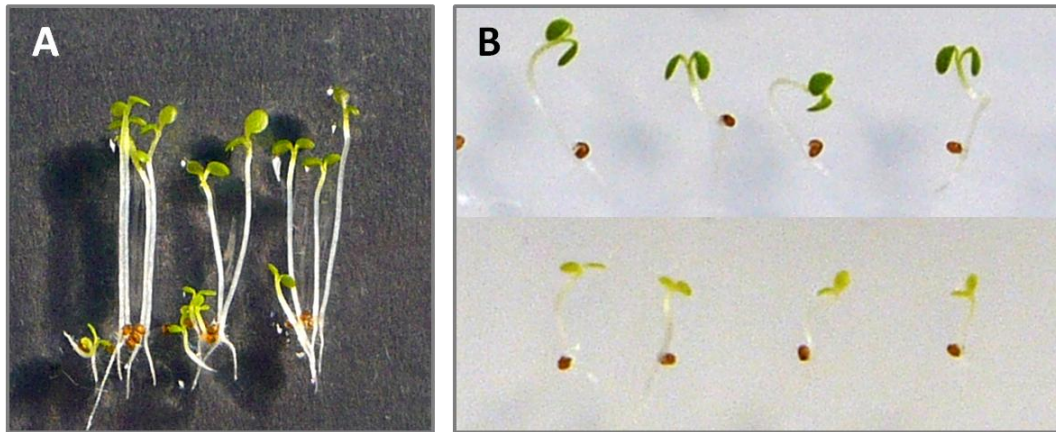


Abbildung 7: Beispiele einer Selektion transgener Keimlinge mittels Hygromycin und Kanamycin

Ergebnis nach Selektion (A) 3 Tage alter GFP:AGD12-Keimlinge einer T2-Population auf 15 µg/ml Hygromycin mit Größenunterschieden zwischen kurzen Wildtyp-Keimlingen und längeren Keimlingen mit T-DNA-Insertion sowie (B) 4 Tage alten AGD12:GFP-Keimlingen einer T2-Population auf 500 µg/ml Hygromycin mit unterschiedlicher Blattfärbung bei Keimlingen mit T-DNA-Insertion (grün) und ohne Insertion (etioliert).

So wurden T1-Samen, im Fall einer Transformation mit pGFP:AGD11, pGFP:AGD12, pGFP:AGD13 und pMDC44 (Curtis und Grossniklaus, 2003), oberflächensterilisiert und auf ½ MS-Phytigel mit 15 µg/ml Hygromycin aufgebracht. Diese wurden anschließend für 2 Tage in Dunkelheit bei 4°C gelagert, 8 Stunden mit 10 µmol/m²s Weißlicht bei 20 °C bestrahlt und abschließend 3 Tage in Dunkelheit bei 20 °C angezogen. Keimlinge ohne T-DNA-Insertion wiesen eine reduzierte Länge durch Hygromycin auf. Dagegen zeigten T1-Keimlinge im Fall erfolgreicher Transformation eine normale Länge und konnten folglich leicht von der restlichen Population selektiert werden (Abb. 7A).

Im Fall von T1-Keimlingen nach Transformation mit pAGD11:GFP, pAGD12:GFP, pAGD13:GFP und pK7FWG2 (Karimi et al., 2002) erfolgte die Selektion über Kanamycin. Dabei wurde die Wirkung von Kanamycin durch die Anwesenheit von Phytigel verringert (Chevreau et al., 1997; Laine et al., 2000) folglich wurde dessen Konzentration in ½ MS-Phytigel von 50 µg/ml auf 500 µg/ml Kanamycin erhöht. Die zu untersuchenden T1-Samen wurden oberflächensterilisiert und auf ½ MS-Phytigel mit 500 µg/ml Kanamycin ausgebracht. Diese wurden anschließend für 2 Tage in Dunkelheit bei 4°C gelagert, 8 Stunden mit 10 µmol/m²s Weißlicht bei 20 °C bestrahlt und abschließend 3 Tage in Dunkelheit bei 20 °C angezogen. Abschließend wurden die Keimlinge für 24 Stunden mit 10 µmol/m²s Weißlicht bestrahlt. Dabei zeigten Keimlinge ohne T-DNA-Insertion eine durch Kanamycin gehemmte Ergrünung. Im Fall einer erfolgreichen Transformation zeigten T1-Keimlinge hingegen eine normale Deetiolierung der Kotyledonen und konnten anschließend isoliert werden (Abb. 7B).

Über Antibiotika selektierte T1-Pflanzen (ca. 4 % der Keimlingspopulation) wurden katalogisiert (Tabelle 21) und unter Langtagbedingungen weiter angezogen. Eine anschließende zweite Selektion erfolgte über genomische DNA und Standard-PCR bzw. mittels *Phire Plant Direct PCR Kit*, bei der

Blattmaterial direkt einer PCR zugeführt wurde (s. Seite 40). Die zur Verifizierung verwendeten Primer binden Intron-übergreifend innerhalb der proteincodierenden Sequenzen von *AGD11*, *AGD12* und *AGD13* (Tabelle 14). Somit wurde im Fall einer Wildtyppflanze die genomische DNA-Sequenz des betreffenden Gens amplifiziert. Bei erfolgreicher T-DNA-Insertion erfolgte eine zusätzliche Amplifikation der im T-DNA-Konstrukt enthaltenen kürzeren AGD-Sequenz ohne Intron. Als Folge dessen konnte eine T-DNA-Insertion in den T1-Pflanzen AGD11:GFP #1 - #12, AGD12:GFP #1 - #6 und AGD13:GFP #1 - #3 nachgewiesen werden (Tabelle 21).

Im Fall von Pflanzen mit GFP:AGD11/12/13-Konstrukt erfolgte eine zusätzliche Verifizierung mittels PCR gegen die komplette T-DNA-Insertion. So wurden Primer verwendet, welche im Bereich des 35S-Promotors und NOS-Terminator binden als auch Primer gegen die Sequenzen der AGDs und GFP. Als Resultat konnte bei den T1-Pflanzen GFP:AGD11#1 - #4, GFP:AGD12#1 - #3 und GFP:AGD13#1 - #7 eine T-DNA-Insertion nachgewiesen werden (Tabelle 21). Zusätzlich erfolgte ein Nachweis des GFP-Transkripts mittels PCR bei späteren T2-Populationen GFP:AGD12#1-3, was die Expression der GFP:AGD12-Fusion bestätigte.

Tabelle 14: Primer-Kombinationen zur Verifizierung von AGD11/12/13-Überexprimierenderlinien

Zielsequenz	Primer-Paar	CDS bzw. T-DNA-Konstrukt	gDNA mit Intron
<i>AGD11</i>	CM111/CM112	158 bp	233 bp
<i>AGD12</i>	CM113/CM114	148 bp	238 bp
<i>AGD13</i>	CM115/CM116	154 bp	239 bp
T-DNA komplett (35S - Term)	CM130/CM131	2171 bp (GFP:AGD11) 2027 bp (GFP:AGD12) 2024 bp (GFP:AGD13)	- - -
GFP:AGD11	CM127/CM112	1269 bp	-
GFP:AGD12	CM127/CM114	1111 bp	-
GFP:AGD13	CM127/CM116	1141 bp	-
GFP	CM127/CM128	159 bp	-

Erfolgreich verifizierte T1-Pflanzen wurden rückgekreuzt. Die aus dieser Selbstbefruchtung resultierenden T2-Samen wurden mittels Hygromycin bzw. Kanamycin auf T-DNA-Insertion getestet. Dabei zeigte sich hinsichtlich der Antibiotika-Resistenz innerhalb einer T2-Population, in Übereinstimmung mit dem 2. Mendelschen Gesetz, ein 3:1 Verhältnis hinsichtlich des zu beobachtenden Phänotyps. Derart resistente T2-Pflanzen wurden für den weiteren Züchtungsverlauf zusätzlich mittels Buchstaben katalogisiert (Abb. 8 und Tabelle 21). Dabei war davon auszugehen, dass die untersuchte T2-Populationen ein 1:2:1 Verhältnis hinsichtlich des Genotyps aufweisen. Demnach sollte ein Viertel jeder T2-Population homozygot bezüglich der T-DNA-Insertion sein. Um diese homozygoten T2-Pflanzen und ihre ebenfalls homozygoten Nachkommen zu bestimmen, wurden diese rückgekreuzt. Daraus resultierende T3-Populationen wurden ebenfalls mittels Kanamycin bzw. Hygromycin getestet. Dabei zeigte sich im Fall homozygoter T2-Pflanzen bzw. T3-Populationen eine Resistenz bei allen Keimlingen einer T3-Population. Derart charakterisierte T3-Populationen bzw. Samen wurden, wie

die vorangegangene T2-Pflanze, mittels Nummern und Buchstaben katalogisiert (Abb. 8 und Tabelle 21) und im weiteren Verlauf durch physiologische Versuche (Abb. 44 bis Abb. 52) sowie durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 41 bis Abb. 43).

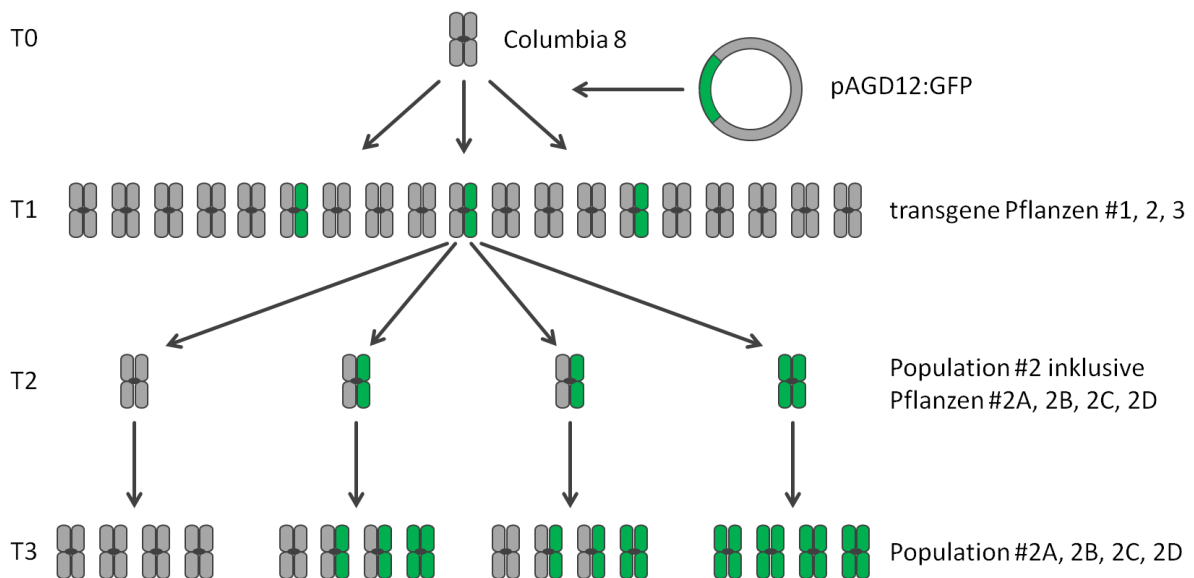


Abbildung 8: Zucht und Katalogisierung von T-DNA-Insertionslinien am Beispiel von AGD12:GFPox

Transformation von T0-Pflanzen des Wildtyps Columbia 8 mit pAGD12:GFP per *floral dip* resultiert in T1-Nachkommen mit geringer Chance von $\approx 4\%$ auf T-DNA-Insertion. Aus transgenen T1-Pflanzen hervorgehende T2-Population zeigt Verteilung der Genotypen im Verhältnis von 1:2:1. Ein Viertel der T2-Pflanzen ist demnach homozygot und bringt eine komplett homozygote T3-Population hervor.

3. 1. 22. Zucht von AGD12-Komplementation und DR5::GUS-Linien

Nach der Generierung von T-DNA-Insertionslinien mit AGD-Überexpression wurden AGD12-Komplementationslinien erstellt. Dazu wurde die Mutante *agd12-9* über *floral dip* mit pAGD12:GFP bzw. pGFP:AGD12 transformiert. Stabil transformierte T1-Pflanzen wurden über ihre Kanamycin- bzw. Hygromycin-Resistenz ermittelt und abschließend mittels *Phire Plant Direct PCR* verifiziert. Dazu wurden die Primer CM113/CM126 bzw. CM114/CM127 für eine PCR gegen das AGD12:GFP-Fusionskonstrukt sowie CM113/CM114 für eine PCR gegen die eingebrachte CDS von AGD12 verwendet. Danach wurden je sechs T1-Pflanzen bis zu ihrer Samenreife angezogen und die daraus resultierenden Nachkommen, ähnlich wie bei der Zucht normaler AGD-Überexpressionslinien, mittels Rückkreuzung und Selektion bis zur T3-Generation gezüchtet (s. Abb. 8 und Tabelle 22).

Zudem erfolgten Kreuzungen mit DR5::GUS-Pflanzen (Jefferson et al., 1987; Ulmasov et al., 1997). Dafür verwendete Kreuzungspartner waren Pflanzen der AGD11-, AGD12-, und AGD13-Überexpressionslinien mit dem dazugehörigen Wildtyp Columbia 8, die EHB1-Überexpressionslinie MAM08 mit dazugehörigem Wildtyp Columbia Gießen sowie eine *nph3*-Mutante. Dazu wurden Pflanzen betreffender Linien unter Langtagbedingungen bis zur Blüte angezogen. In Abhängigkeit des jeweiligen

Selektionsmarkers wurde jedem Kreuzungspartner die Rolle des Pollen-Donor oder Pollen-Akzeptor zugeteilt (Tabelle 15). So wurden reife Staubblätter aus der Blüte des Donor entfernt und der darin enthaltene Pollen zur Bestäubung des Stempels des Akzeptors verwendet. Nachkommen aus einer Befruchtungen mit *DR5::GUS*-Pollen wurden mittels Hygromycin selektiert. Danach erfolgte eine zusätzliche *Phire Plant Direct PCR* mit den Primern CM140/CM141. Diese diente dem Nachweis des *GUS*-Gens in den Nachkommen von Columbia Gießen, Columbia 8 und AGD12:GFP. Im Fall von Kreuzungen, bei denen Pollen-Donor und Akzeptor über eine Hygromycin-Resistenz verfügten, wurden PCRs gegen die CDS der entsprechenden *AGD*-Gene durchgeführt (Tabelle 14).

Tabelle 15: Strategie für DR5::GUS-Kreuzungen

Kreuzung mit DR5::GUS (HygR)	Donor ♂	Akzeptor ♀	Selektion
Columbia 8	DR5::GUS	Columbia 8	Hyg
AGD11:GFP (KanR)	DR5::GUS	AGD11:GFP	Hyg
AGD12:GFP (KanR)	DR5::GUS	AGD12:GFP	Hyg
AGD13:GFP (KanR)	DR5::GUS	AGD13:GFP	Hyg
GFP:AGD11 (HygR)	GFP:AGD11	DR5::GUS	PCR gegen <i>AGD11</i> CDS
GFP:AGD12 (HygR)	GFP:AGD12	DR5::GUS	PCR gegen <i>AGD12</i> CDS
GFP:AGD13 (HygR)	GFP:AGD13	DR5::GUS	PCR gegen <i>AGD13</i> CDS
Columbia Gießen	DR5::GUS	Columbia Gießen	Hyg
MAM08 (KanR)	DR5::GUS	MAM08	Hyg
<i>nph3</i> (KanR)	DR5::GUS	<i>nph3</i>	Hyg

3. 2. Interaktionsanalyse *in vivo* mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System

3. 2. 1. Grundlagen des Hefe-Zwei-Hybrid-System

Proteininteraktionsstudien mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System basierte auf dem *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System* (Clontech Laboratories Inc., 2009). Dabei wurden Hefen des Stamms Y2HGold mit je einem Köder- und Beuteplasmid doppeltransformiert (Tabelle 18). Die auf diesen Plasmiden enthaltenen Genkonstrukte wurden folglich in Hefe unter Kontrolle eines γ ADH1-Promotors auf hohem Level konstitutiv exprimiert und daraus resultierende Fusionsproteine mit Hilfe eines NLS in den Zellkern transportiert. Betreffende Fusionsproteine setzten sich dabei jeweils aus einem auf Interaktion zu testenden Protein sowie einer Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors zusammen. Dabei gingen aus einem Beuteplasmid Beuteproteine mit GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert mit einem Kandidatenprotein hervor. Aus einem Köderplasmid resultierten hingegen Köderproteine bestehend aus GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert mit einem zweiten Kandidatenprotein. Die Expression von Köder- und Beuteprotein und deren Lokalisation im Zellkern erlaubten für den Fall, dass beide Kandidatenproteine interagieren eine funktionelle Reassemblierung des GAL4-Transkriptionsfaktors (Brückner et al., 2009; Chien et al., 1991; Fields und Song, 1989). Dieser rekrutiert die RNA-Polymerase 2 und anderen Bestandteilen der Transkriptionsmaschinerie an GAL4-abhängigen Promotoren und erlaubt so die Transkription diverser Reportergenkonstrukte in Hefe (Abb. 9).

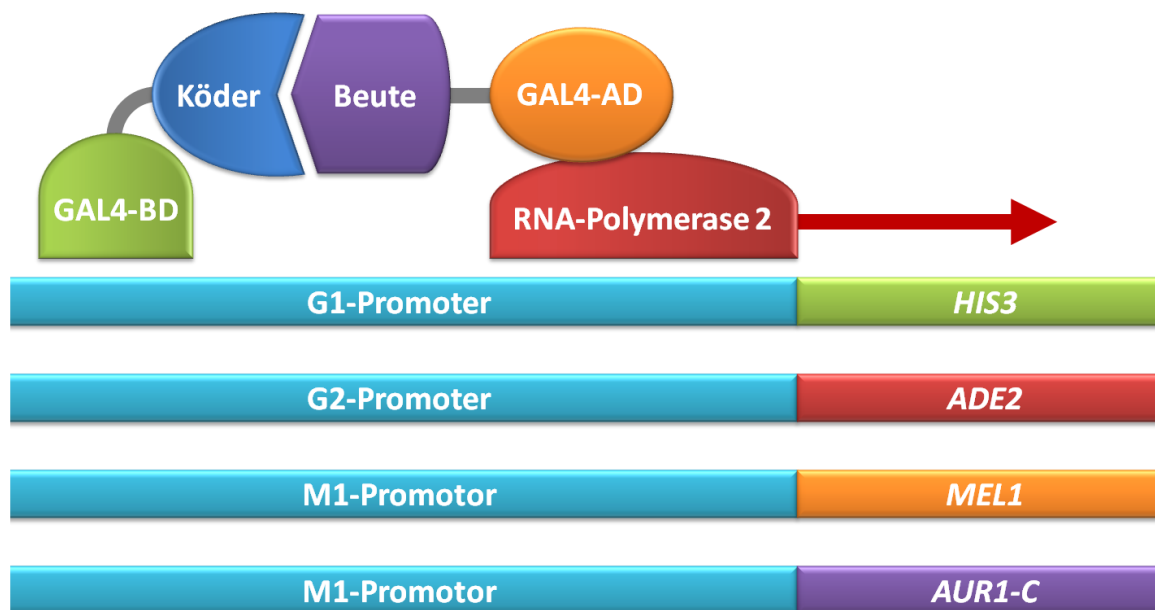
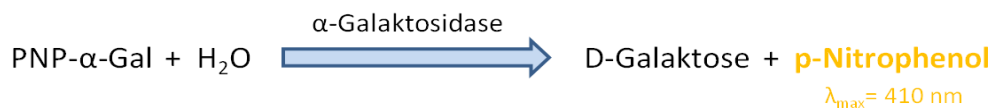


Abbildung 9: Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zum Nachweis von Proteininteraktionen

Schematische Darstellung einer Proteininteraktion zwischen Köderprotein mit GAL4-Bindedomäne (BD) und Beuteprotein mit GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) im Hefe-Zwei-Hybrid-System bei Y2HGold. Proteininteraktion führt zur Reassemblierung des GAL4-Transkriptionsfaktors und folglich zur Expression von Reportergenen zur Synthese von Histidin (*HIS3*), Adenin (*ADE2*), α -Galaktosidase (*MEL1*) und Inositol-Phosphorylceramide-Synthase (*AUR1-C*) für eine Resistenz gegen Aureobasidin A. Reportergene unterliegen dabei der Kontrolle von Promotoren mit unterschiedlichen GAL-Promotorelementen (G1, G2 und M1).

Die Menge der gebildeten Transkripte diente folglich als Indikator einer Proteininteraktion im Hefe-Zwei-Hybrid-System, wie unter anderen das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Enzym α -Galaktosidase. So konnten Hefezellen des verwendeten Stamms Y2HGold mit interagierenden Köder- und Beuteproteinen durch das Ablesen der Reportergene auf selektivem Minimalmedium ohne die Aminosäure Histidin (*-Leu -Trp -His Triple Dropout Medium*) bzw. zusätzlich ohne die Nukleinbase Adenin (*-Leu -Trp -His -Ade Quadruple Dropout Medium*) wachsen. Zusätzlich konnte durch Verwendung des Hefespezifischen Antibiotikum Aureobasidin A (AbA) eine weitere Verstärkung des Selektionsdrucks erzeugt werden. Dieser Umstand bildet die Grundlage für durchgeführte Interaktionsstudien auf *Dropout*-Medium (Seite 61 und 73).

Das α -Galaktosidase-Assay beruhte hingegen auf der Quantifizierung von α -Galaktosidase, welche als Folge einer Interaktion zwischen Köder- und Beuteproteinen von Hefezellen gebildet und in das umgebende Medium abgegeben wurde (Goddard et al., 2005). Die anschließende Quantifizierung erfolgte über den enzymatischen Umsatz bzw. Hydrolyse des Substrats 4-Nitrophenyl- α -D-Galaktopyranosid (PNP- α -Gal) zu D-Galaktose und dem gelblichen p-Nitrophenol (Formel 3). Letzteres konnte aufgrund seiner Gelbfärbung bei $\lambda_{\max} = 410 \text{ nm}$ quantifiziert werden und erlaubte so Rückschlüsse auf Konzentration der α -Galaktosidase bzw. ermöglicht eine Quantifizierung der Proteininteraktion (Seite 62 und 76).



Formel 3: Reaktionsgleichung zum Ablauf des α -Galaktosidase-Assay

Formel der α -Galaktosidase-abhängigen Hydrolyse des Substrats 4-Nitrophenyl- α -D-Galaktopyranosid (PNP- α -Gal) zu D-Galaktose und p-Nitrophenol mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 410 \text{ nm}$.

3. 2. 2. Klonierung von Hefe-Expressionsvektoren

Für die Untersuchung der Proteininteraktionen von AGD12 und EHB1 mit diversen Adenosyl-Ribosylierungs-Faktoren (ARF) erfolgte im Vorfeld eine Auswahl von fünf Versuchskandidaten aus der Gruppe der 22 ARF-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*. Die Auswahl erfolgte anhand von Untersuchungen der Protein-Sequenzübereinstimmung (Abb. 12) sowie Hinweisen aus Fachliteratur. So wurden aus jeder Untergruppe der ARF-Proteine jeweils ein Protein mit möglichem Bezug zu Photo- und Gravitropismus ausgewählt. Folglich wurden neben den codierenden Sequenzen von AGD12 und EHB1 auch Primer zur Amplifikation der codierenden Sequenz von ARFA1C, ARFB1B, ARLA1D, SARA1A und ARF3 mit attB-Überhängen zur Gateway-Klonierung konstruiert (Tabelle 16). Template für die jeweilige PCR stelle cDNA des Wildtyps Columbia 0 dar.

Tabelle 16: Kandidaten für Untersuchung der Proteininteraktion inklusive zugehöriger *attB*-Primer

Gen	AGI-Code	<i>forward</i> -Primer	<i>reverse</i> -Primer
<i>AGD12</i>	AT4G21160.1	CM142 attB1-agd12	CM143 attB2-agd12
<i>EHB1</i>	AT1G70800.1	CM144 attB1-ehb1	CM145 attB2-ehb1
<i>ARFA1C</i>	AT2G47170.1	CM146 attB1-ArfA1c	CM147 attB2-ArfA1c
<i>ARFB1B</i>	AT5G17060.1	CM150 attB1-ArfB1b	CM151 attB2-ArfB1b
<i>ARLA1D</i>	AT5G67560.1	CM152 attB1-ArlA1d	CM153 attB2-ArlA1d
<i>SARA1A</i>	AT1G09180.1	CM154 attB1-SarA1a	CM155 attB2-SarA1a
<i>ARF3</i>	AT2G24765.1	CM156 attB1-Arf3	CM157 attB2-Arf3

Nach Amplifikation und Aufreinigung mit PEG/MgCl₂ wurden die codierenden Sequenzen über *attB*-Überhänge im Zuge von BP-Clonase-Reaktionen in den Vektor pDONR221 kloniert. Derart entstandene *Entry*-Vektoren wurden mittels Transformation von *E. coli* DH5α und anschließender Selektion über die in pDONR221 enthaltene Kanamycin-Resistenz selektioniert. Zudem wurde die Insertion der Sequenz von *AGD12*, *EHB1* und der *ARF*-Gene in pDONR221 mittels *Colony*-PCR verifiziert bevor die Plasmide mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* nach Vorgaben des Herstellers extrahiert wurden.

Für die darauffolgende Erstellung der Expressionsvektoren wurden die zwei *Destination*-Vektoren pGADT7-GW und pGBKT7-GW verwendet. So wurden für die spätere Expression von Beute-Proteinen d.h. Proteine fusioniert mit GAL4-Aktivierungsdomäne *Entry*-Vektoren zusammen mit pGADT7-GW der LR-Clonase-Reaktion zugeführt. Zudem wurden für die spätere Expression von Köder-Proteinen d.h. Proteine fusioniert mit GAL4-DNA-Bindedomäne *Entry*-Vektoren zusammen mit pGBKT7-GW der LR-Clonase-Reaktion zugeführt. Daraus resultierende Expressionsvektoren wurden entsprechend der ursprünglichen *Destination*-Vektoren sowie der eingebrachten Gene bezeichnet (Tabelle 18).

3. 2. 3. Herstellung chemisch kompetenter Hefen

Die Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen erfolgte anhand des *Yeast Transformation System 2 User Manual* (Clontech Laboratories Inc., 2008). Dazu wurde im Vorfeld Hefe des Stamms Y2HGold auf Platten mit YPD-Medium ausgestrichen und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Resultierende Kolonien wurden in 50 ml YPD-Medium überführt und über Nacht bei 30 °C mit 250 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurden die Kultur in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min mit 2000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 ml frisches YPD-Medium überführt um erneut bei 30 °C mit 250 rpm geschüttelt zu werden. Nach 6 Stunden wurde die Kultur in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, erneut für 5 min mit 2000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in je 30 ml sterilem ddH₂O resuspendiert um anschließend erneut für 5 min mit 2000 g abzentrifugiert zu werden. Anschließend wurde der Überstand nochmals verworfen, die Zellen in je 1,5 ml 1.1xTE/LiAc resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 15 s mit 12000 g pelletiert, der Überstand erneut verworfen und die Zellen letztlich in je 600 µl 1.1xTE/LiAc resuspendiert.

Die chemisch kompetenten Hefezellen konnten bis zu ihrer Transformation für einige Stunden auf Eis gelagert werden.

3. 2. 4. Transformation chemisch kompetenter Hefen

Die Transformation chemisch kompetenter Hefezellen erfolgte anhand des *Yeast Transformation System 2 User Manual* (Clontech Laboratories Inc., 2008). Dabei wurden jedoch, anders als im Herstellerprotokoll, kompetente Hefen nicht in zwei aufeinander folgenden Transformationen mit Köder- und Beuteplasmiden transformiert sondern beide Plasmide im Zuge einer Doppeltransformation eingebracht. Dies führte zu einer reduzierten Transformationseffizienz und bedingte, dass erfolgreiche Transformaten auf Platten mit *-Leu -Trp Double Dropout Medium* (DD-Medium) selektioniert wurden.

Dazu wurden im Vorfeld pro Transformationsansatz 5 µl Yeastmaker Carrier DNA zweimal für 5 Minuten auf 98 °C erhitzt und daraufhin mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. Der so denaturierten Carrier DNA wurden je Transformationsansatz jeweils 200 ng Köderplasmid und 200 ng Beuteplasmid (Tabelle 18) sowie 50 µl kompetente Hefezellen zugegeben. Nach Zugabe von je 500 µl PEG/LiAc-Lösung wurden die Ansätze gevortext und für 30 min mittels Heizblock bei 30 °C inkubiert. Dabei wurde die Inkubation aller 10 min für erneutes Vortexen unterbrochen. Anschließend wurden die Ansätze mit je 20 µl DMSO versehen, erneut gevortext und für 15 min mittels Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Dabei wurde auch hier die Inkubation aller 5 Minuten für erneutes Vortexen unterbrochen. Daran anschließend wurden die Zellen mit 12000 g für 15 s abzentrifugiert, der Überstand verworfen, 1 ml YPD zugegeben und für 30 min bei 30 °C durch Thermomixer mit 500 rpm geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation mit 12000 g für 15 s wurde der Überstand verworfen, die Zellen in je 200 µl 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert und der komplette Transformationsansatz auf Platten mit DD-Medium ausplattiert. Erfolgreich transformierte Hefezellen bildeten nach 2 bis 5 Tagen im 29 °C Inkubator Kolonien.

3. 2. 5. Lagerung transformierter Hefezellen

Zur Langzeitlagerung transformierter Hefeklonen nach Sherman, 1986 wurden Glycerin-Stocks angelegt. So wurden Hefen wahlweise in flüssiges *-Leu -Trp Double Dropout Medium* (DD-Medium) über Nacht bei 29 °C mit 250 rpm angezogen oder auf Platten mit DD-Medium für 3 Tage bei 29 °C inkubiert und gewachsene Kolonien von der Platte in flüssiges DD-Medium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gevortext. Je 500 µl Hefe in DD-Medium wurden 500 µl steriles 30 % (v/v) Glycerin zugegeben. Abschließend wurde der Ansatz durch starkes Vortexen gemischt und bei -70 °C gelagert.

3. 2. 6. Interaktionsstudien mittels *Dropout*-Medium

Interaktionsstudien mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden unter anderem über *Dropout*-Medien durchgeführt. Dazu wurde Hefeklone mit unterschiedlichen Kombinationen von Beute- und Köderproteinen in 10 µl 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert und je 2 µl der Suspension auf Petrischalen mit verschiedenen *Dropout*-Medien übertragen. Dabei wurde zwischen Versuchen mit *Dot*-Platten und Ausstrichplatten unterschieden (Abb. 10).

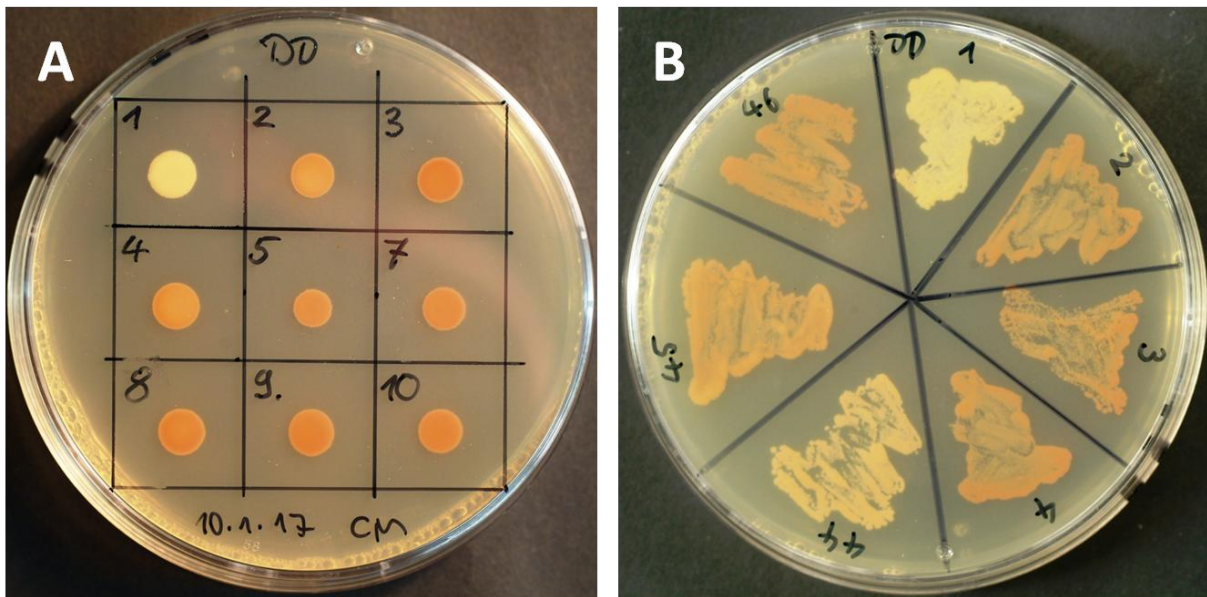


Abbildung 10: Versuchsanordnung für Interaktionsstudien auf *Double Dropout Medium*

(A) *Dot*-Platte mit neun Hefeklonen nach sieben Tagen Wachstum bei 29 °C. (B) Ausstrichplatten mit sieben ausgestrichenen Hefeklonen nach fünf Tagen Wachstum bei 29 °C.

So wurden im Fall von *Dot*-Platten je 2 µl Hefe-Suspension auf Petrischalen mit *-Leu -Trp Double Dropout* und *-Leu -Trp -His -Ade Quadruple Dropout Medium* getropft, für 7 Tage bei 29 °C inkubiert und abschließend das Wachstum mittels Kamera dokumentiert (Abb. 10A). Dies erlaubte eine einfache Unterscheidung zwischen Hefe mit bzw. ohne Proteininteraktion (Tabelle 19). Dem entgegen wurde im Fall von Ausstrichplatten je 2 µl Hefe-Suspension auf Petrischalen mit *-Leu -Trp Double*, *-Leu -Trp -His Triple* sowie *-Leu -Trp -His -Ade Quadruple Dropout Medium* getropft und mit Impöse flächig ausgestrichen. Nach anschließender Inkubation der Platten bei 29 °C wurde nach 2 und 5 Tagen das Wachstum der Hefen mittels Kamera dokumentiert (Abb. 10B). Das Wachstum der Hefen wurde anschließend mittels einer Skala von (-) für nicht vorhandenes Wachstum bis (+++) für sehr starkes Wachstum eingestuft (Tabelle 20 und Abb. 14). Dabei ermöglichten die größere Oberfläche und Abstufungen des Selektionsdrucks durch die Verwendung von *Triple Dropout Medium* sowie die Zugabe von 200 ng/ml Aureobasidin A zu *Quadruple Dropout Medium* eine genauere Differenzierung des Hefewachstums. So waren, anders als bei *Dot*-Platten, genauere Aussagen zum Hefewachstum und folglich zur Stärke der zu untersuchenden Proteininteraktionen möglich.

3. 2. 7. Interaktionsstudien mittels α -Galaktosidase-Assay

Zur genaueren Quantifizierung möglicher Proteininteraktionen zwischen AGD12, EHB1 und ARF-Proteinen im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde mit allen Hefeklonen ein α -Galaktosidase-Assay nach Goddard et al. 2005 durchgeführt. Dabei wurden Hefekolonien mit unterschiedlichen Kombinationen an Beute- und Köderproteinen in 10 μ l 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert, in je 2 ml *-Leu -Trp Double Dropout Medium* überführt und über Nacht bei 29 °C mit 250 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurde die Zelldichte bzw. optische Dichte bei 600 nm aller Kulturen mittels Photometer bestimmt. Anschließend wurden von jeder Übernachtskultur 1 ml in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die darin enthaltenen Zellen mit 12000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und dreimal je 200 μ l des zellfreien Überstands in je drei Reaktionsgefäße überführt. Den erstellten Triplikaten wurden jeweils 600 μ l α -Gal-Assay-Puffer zugegeben. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit 200 μ l *Double Dropout Medium* und 600 μ l α -Gal-Assay-Puffer erstellt und alle Ansätze für 22 Stunden bei 29 °C mit 500 rpm geschüttelt.

Am Folgetag wurden alle Reaktionen durch Zugabe von je 200 μ l 2M NaCO₃ gestoppt. Eine dadurch auftretende Veränderung des pH-Werts führte zur Deprotonierung des in den Ansätzen befindlichen p-Nitrophenol. Die daraus resultierende Gelbfärbung der Reaktionsansätze in Abhängigkeit zur Menge an p-Nitrophenol konnte im Anschluss quantifiziert werden. Dazu wurden alle Ansätze in 1 ml Küvetten übertragen und deren Absorption bei 410 nm bestimmt. Die zusätzlich erstellte Negativkontrolle diente als Nullwert. Nach Abschluss der Messung wurden die Werte für Zelldichte (OD₆₀₀), p-Nitrophenol (OD₄₁₀) und der Inkubationszeit des Assay t in Minuten zusammengetragen und für jedes Triplikat die Enzymaktivität der α -Galaktosidase in Miller-Units bestimmt (s. Formel 4). Mit den für jedes Triplikat ermittelten Einzelwerten wurden Mittelwerte und Standardfehler für jede in Hefe zu testende Kombination an Köder- und Beuteprotein berechnet und mittels MS Excel graphisch dargestellt (Abb. 14).

Formel 4: α -Galaktosidase [Miller-Units]=

$$\frac{\begin{array}{c} \downarrow 1 \text{ ml} \\ \text{Assay-Volumen} \end{array} \cdot 1000 \cdot \begin{array}{c} \downarrow \text{OD}_{410} \\ \text{p-Nitrophenol} \end{array}}{\begin{array}{c} \uparrow 0,2 \text{ ml} \\ \text{Kultur-Volumen} \end{array} \cdot \begin{array}{c} \uparrow t \text{ in min} \\ \text{Reaktionszeit} \end{array} \cdot \begin{array}{c} \uparrow \text{OD}_{600} \\ \text{Zelldichte} \end{array}}$$

3. 3. Physiologische Experimente mit *Arabidopsis thaliana*

3. 3. 1. Vorbereitung: Oberflächensterilisation und Brechen der Samenruhe

Im Vorfeld physiologischer Experimente mit Keimlingen von *A. thaliana* wurden Samen mittels Sterilisations-Lösungen für 10 Minuten oberflächensterilisiert und abschließend fünfmal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Die so gereinigten Samen wurden mittels Pipette auf die Oberfläche des jeweils verwendeten Mediums in Petrischalen übertragen. Zum Brechen der Samenruhe wurden die so präparierten Platten für 2 Tage bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Das anschließende Brechen der Samenruhe erfolgte 6 Stunden Bestrahlung mit 10 µmol/m²s Weißlicht bei 20 °C. Bedingt durch die jeweilige Art des Versuchs wurden die nun keimenden Samen auf senkrecht stehenden Platten für zwei bis drei Tage bei 21 °C in Dunkelheit angezogen. Im Anschluss daran erfolgten die physiologischen Untersuchungen zum Gravitropismus und Phototropismus.

3. 3. 2. Allgemeiner Versuchsaufbau zu Phototropismus und Gravitropismus

Für Experimente zum Photo- und Gravitropismus bei *Arabidopsis thaliana* wurden Hypokotyle und Wurzeln hinsichtlich ihrer phototropen bzw. gravitropen Reaktion untersucht. Die Quantifizierung dieser Reaktion erfolgte über die Bestimmung des Winkels β der Hypokotyl- bzw. Wurzelkrümmung. Dazu wurden die Imagetool-Skripte *Anglesav* und *Anglesav gravitropism* verwendet. Daraus resultierende Einzelwerte dienten der Berechnung von Mittelwerten, Standardfehlern und Varianzanalysen.

Zur Untersuchung des Gravitropismus wurden auf senkrechten ½ MS-Phytigel-Platten gewachsene Keimlinge mit unterschiedlichen Inklinationswinkeln (α) gekippt (Abb. 11A). Dabei wirkte laut Sinusgesetz mit steigendem Inklinationswinkel bis 90°, ein zunehmender Schwerkraftreiz auf die Keimlinge ein (Galland, 2002; Iino et al., 1996; von Sachs, 1882). Dies führte zu entsprechenden gravitropen Reaktionen bei Hypokotyl und Wurzel. Beim Sonderfall einer Inklination von 180° wurden für die Berechnungen Einzelwerte ohne Vorzeichen verwendet. So auch im Sonderfall der Clinostat-Zentrifugation (s. Seite 66 und Abb. 26A) mit der die einwirkende Erdbeschleunigung minimiert und ein Schwerkraftreiz bis umgerechnet 3 g per Zentrifugation künstlich erzeugt werden kann. Dabei wurde die Ausrichtung des vorherrschenden Schwerkraftvektors über die jeweilige Orientierung der Keimlinge innerhalb der Zentrifuge definiert (Abb. 26A).

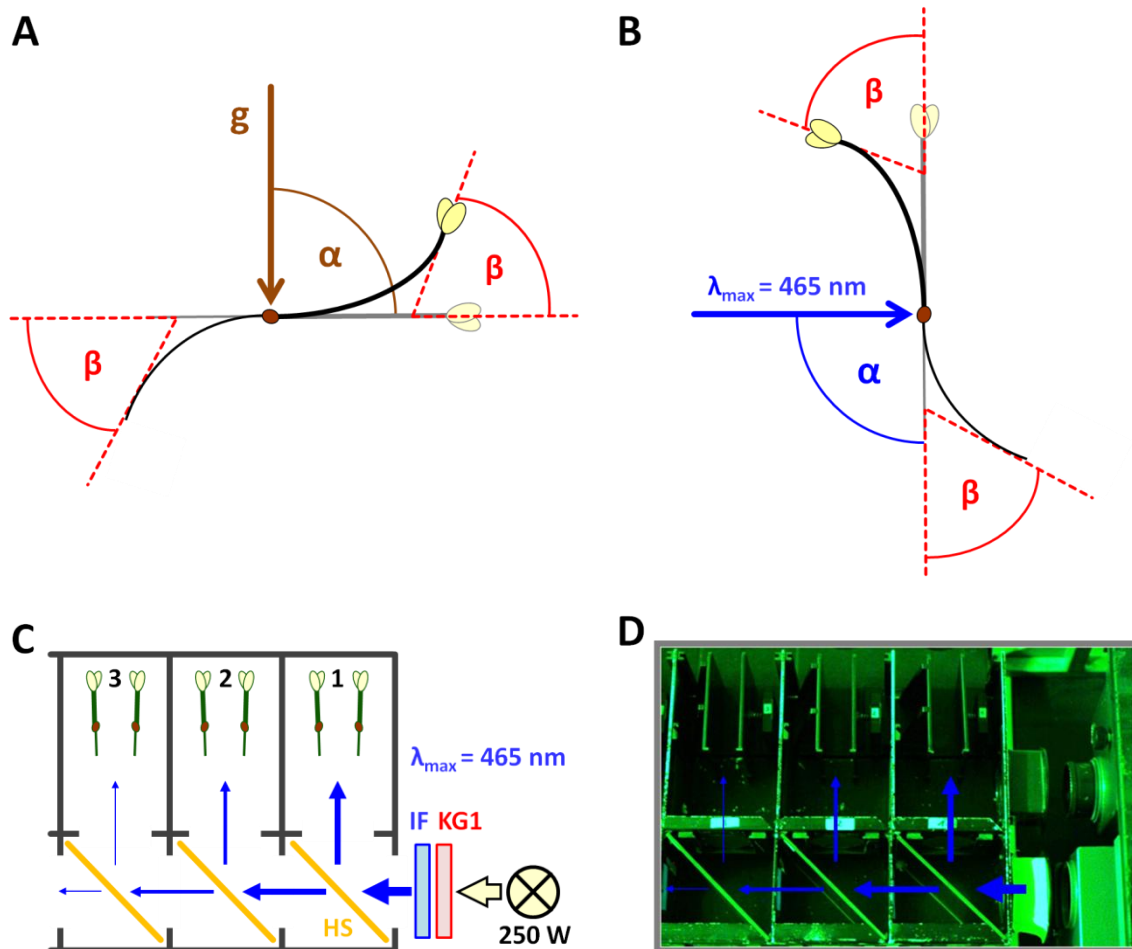


Abbildung 11: Versuchsaufbau physiologischer Untersuchungen zu Gravi- und Phototropismus

Versuchsaufbau für Untersuchungen des (A) Gravitropismus und (B, C, D) Phototropismus und an Keimlingen von *Arabidopsis thaliana*. Der dabei applizierte Reiz traf mit dem Winkel α auf Keimlinge. (A) Bei Untersuchungen zum Gravitropismus variierte Auftreffwinkel α bzw. entsprach der jeweiligen Inklination. (B) Bei Versuchen zum Phototropismus hingegen entsprach α stets 90° (B). Die in beiden Fällen resultierende Krümmung von Hypokotyl und Wurzel wurde als Winkel β ermittelt. (C) Schematische Darstellung der für Phototropismus verwendeten Strahlteilerbox inklusive Belichtungskammer 1, 2 und 3 mit Halbleiterspiegeln (HS), Interferenzfilter (IF), Hitzefilter (KG1) und 250 W Lichtquelle. (D) Foto der Strahlteilerbox unter grünem Sicherheitslicht mit Markierung des Strahlengangs.

Zur Untersuchung des Phototropismus wurden Strahlteilerboxen verwendet (Galland, 2002; Grolig et al., 2000). Diese ermöglichten eine parallele Belichtung mehrerer Keimlingspopulationen mit unterschiedlich hohen Fluenzraten (s. Abb. 11C und D). Hierzu diente ein Diaprojektor mit 250 W Glühlampe als Lichtquelle. Das so erzeugte Weißlicht wurde durch einen KG1-Hitzefilter und schließlich durch einen IL-Interferenzfilter mit einem Transmissionsmaximum von 465 nm (Abb. 6) in die Strahlteilerbox geleitet. Das so erzeugte Blaulicht traf innerhalb der Strahlteilerbox in einem Winkel von 45° auf den ersten einer Reihe von halbdurchlässigen Spiegeln. Dieser teilte den Lichtstrahl indem er zu einem Teil vom Halbspiegel reflektiert wurde und Keimlinge belichtete. Zum anderen Teil passierte das Licht jedoch den Halbspiegel und traf anschließend auf einen nachgelagerten Halbspiegel und wurde dort erneut aufgeteilt. Die Aufteilung des reflektierten und passierenden Lichts bewegte sich dabei in einem Bereich von 40 % - 60 %. So konnten Keimlinge auf senkrecht stehenden Platten innerhalb der 10 Kammern einer Strahlteilerbox mit Licht unterschiedlicher Fluenzrate bei

gleicher Wellenlänge bestrahlt werden (Abb. 11B, C und D). Die Messung der resultierenden Fluenzraten für jede Kammer erfolgte mittels Optometer. Zur Unterscheidung von Wildtypen und Mutanten wurden pro Kammer je eine Platte mit Mutanten und Wildtyp-Keimlingen bestückt. So wurden direkte Vergleiche zwischen beiden Genotypen ermöglicht.

3. 3. 3. Längenbestimmung von *agd12-9* und Columbia 8

Zum Vergleich des Längenwachstums bei Keimlingen der Mutante *agd12-9* und dessen isogenen Wildtyp Columbia 8 wurden Keimlinge 4 Tage in Dunkelheit bei 21 °C auf ½ MS-Phytigel mit 1 % Saccharose bzw. ohne Saccharose angezogen. Die Bestimmung und Auswertung der Gesamtlänge sowie Hypokotyl- und Wurzellänge erfolgte mittels des Programms *ImageJ*. Die Darstellung der Resultate und Berechnung der Mittelwerte und Standardfehler erfolgte durch MS Excel (Abb. 20).

3. 3. 4. Dosis-Wirkungs-Kurven für Hypokotyl-Phototropismus

Zur Untersuchung des Hypokotyl-Phototropismus der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8, in Abhängigkeit zur Fluenzrate, wurden Keimlinge auf senkrecht stehenden Platten mit ½ MS-Phytigel 3 Tage in Dunkelheit angezogen. Diese wurden anschließend für 24 Stunden in je eine von zehn Kammern der Strahlteilerbox senkrecht platziert und mit unterschiedlichen Fluenzraten belichtet. Bei einem Teil der Versuche wurde die ansonsten statische Strahlteilerbox samt Lichtquelle permanent mit 1 rpm gedreht. Somit wurden die Keimlinge zusätzlich zur Blaulichtbestrahlung clinostatisiert und somit der Schwerkraftstimulus minimiert. Parallel dazu wurden bei allen Versuchen Dunkelkontrollen erstellt. Nach Abschluss der Versuche wurden die Keimlinge mittels Kamera dokumentiert. Der Winkel der resultierenden Hypokotyl-Krümmung wurden mittels des Programms *Imagetool* ermittelt und grafisch mittels Microsoft Excel dargestellt (Abb. 21). Untersuchungen an T-DNA-Insertions-Linien mit *AGD11*-, *AGD12*- oder *AGD13*-Überexpression erfolgten nach vergleichbarem Muster.

3. 3. 5. Kinetik des Hypokotyl-Phototropismus von *agd12-9*

Um den Hypokotyl-Phototropismus der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 in Abhängigkeit zur Belichtungszeit zu bestimmen, wurden Keimlinge auf senkrechten Platten mit ½ MS-Phytigel 3 Tage lang angezogen. Diese wurden anschließend senkrecht stehend für 24 bzw. 48 Stunden seitlich mit $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ (Abb. 22A) bzw. $7,4 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ (Abb. 22B) Blaulicht bestrahlt. Im Verlauf der Belichtung wurde die phototrope Krümmung in zeitlichen Abständen dokumentiert. Die in Abhängigkeit zur Belichtungszeit erfolgte Krümmung der Hypokotyle wurde mittels *Imagetool* ermittelt und die Resultate mittels MS Excel dargestellt (Abb. 22).

3. 3. 6. Wurzel-Phototropismus von *agd12-9* und *ehb1-2*

Um den Wurzelphototropismus der Mutante *agd12-9* und deren isogenem Wildtyp Columbia 8 sowie der Mutante *ehb1-2* und deren isogenem Wildtyp Columbia 3 zu untersuchen, wurden Keimlinge auf senkrechten stehenden Platten mit ½ MS-Phytigel 2 Tage angezogen. Diese wurden anschließend senkrecht stehend für 48 Stunden in Strahlteilerboxen belichtet. Dabei wurde bei einem Teil der Versuche die ansonsten statische Strahlteilerbox samt Lichtquelle permanent mit 1 rpm gedreht. Durch die Clinostatisierung der Keimlinge parallel zur Bestrahlung wurde der Schwerkraftstimulus minimiert. Des Weiteren wurden entsprechende Dunkelkontrollen bei statischen sowie clinostatisierten Experimente erstellt. Nach Abschluss des Versuchs wurden die Keimlinge mittels Kamera dokumentiert, die resultierende Wurzelkrümmung mittels Imagetool bestimmt und die Resultate per MS Excel dargestellt (Abb. 23 und Abb. 24).

3. 3. 7. Untersuchungen zum Gravitropismus durch Inklination

Zur Untersuchung des Gravitropismus der Mutante *agd12-9* sowie des Wildtyps Columbia 8 wurden Keimlinge beider Genotypen auf senkrecht stehenden Platten mit ½ MS-Phytigel mit 1% bzw. ohne Saccharose 3 Tage lang bei 21 °C in Dunkelheit angezogen. Im Anschluss wurden die etiolierten Keimlinge samt Platten um verschiedene Inklinationenwinkel für 24 Stunden gekippt und anschließend mittels Kamera dokumentiert. Die resultierenden Krümmungen von Hypokotyl und Wurzel wurden per Imagetool ermittelt und mit MS Excel bearbeitet und dargestellt (Abb. 25). Im Fall des Gravitropismus von *agd12-9* und *ehb1-2* in Abhängigkeit von Ca^{2+} wurde ähnlich verfahren (s. Seite 68). Wogegen bei Versuchen zum Gravitropismus der *AGD11*-, *AGD12*- und *AGD13*-Überexpressionslinien die Anzuchtzeit von 3 auf 2,5 Tage vor der Inklination verkürzt wurde.

3. 3. 8. Kinetik des Gravitropismus von *agd12-9*

Um den Gravitropismus der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 in Abhängigkeit zur Inklinationszeit zu bestimmen, wurden 3 Tage alte etiolierte Keimlinge auf senkrechten Platten mit ½ MS-Phytigel um einen Inklinationenwinkel von 90° (Abb. 28A und C) sowie 180° (Abb. 28B und D) gekippt. Dabei wurden die Keimlinge im Verlauf der Versuchsdauer wiederholt fotografiert. Der zeitliche Verlauf der Hypokotyl- und Wurzel-Krümmung wurden mittels Imagetool ermittelt und die Resultate per MS Excel grafisch dargestellt (Abb. 28).

3. 3. 9. Clinostat-Zentrifugation von *agd12-9*

Um das Verhalten der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 bei Schwerkraftreizen von 3 g zu untersuchen, wurden Keimlinge auf senkrecht stehenden Platten mit ½ MS-Phytigel mit 1 % bzw. ohne Saccharose 3 Tage angezogen. Anschließend wurden die Keimlinge derart in eine Clinostat-

Zentrifuge platziert, dass die durch Zentrifugation entstehenden Zentrifugalkraft in einem Winkel von 90° bzw. 180° auf die Pflanzen trifft (Abb. 26A). Anschließend wurden die Keimlinge 24 Stunden lang mittels 1 rpm clinostatisiert um den Effekt der Erdanziehungskraft zu minimieren. Zudem erfolgte eine zeitgleiche Zentrifugation der Keimlinge mit 96 rpm. Dadurch wurde eine Zentrifugalkraft in einer Größenordnung von 3 g erzeugt. Die daraus resultierende Hypokotyl- und Wurzel-Krümmung wurden mittels Kamera dokumentiert, durch *Imagetool* ermittelt und die Resultate per MS Excel bearbeitet und dargestellt (Abb. 26).

3. 3. 10. Statolithen-Färbung in Wurzelspitzen von *agd12-9*

Um eventuelle anatomische Unterschiede zwischen *agd12-9* und Columbia 8 im Bereich der Wurzelspitze zu untersuchen, wurden Keimlinge der zwei Genotypen für 3 bzw. 7 Tage auf ½ MS-Phytigel mit 1 % bzw. ohne Saccharose in Dunkelheit bei 21 °C angezogen. Diese Keimlinge wurden anschließend in 70% Ethanol fixiert, mit Iod-Kaliumiodid-Lösung angefärbt und in eine Klärlösung überführt. Abschließend wurden die Keimlinge lichtmikroskopisch dokumentiert (Abb. 27).

3. 3. 11. Gravitropismus von *agd12-9* in Abhängigkeit von NPA

Zur Klärung, ob AGD12 Einfluss auf den Auxintransport hat, wurden Keimlinge von *agd12-9* und Columbia 8 2,5 Tage auf senkrechten stehenden Platten mit ½ MS-Phytigel in Dunkelheit angezogen. Anschließend wurden die Keimlinge für weitere 24 Stunden um 90° gekippt, die daraus resultierende Ausrichtung von Wurzeln und Hypokotyl mittels Kamera dokumentiert und per *Imagetool* bestimmt. Dabei enthielt das verwendete ½ MS-Phytigel je 0 µM, 0,1 µM, 1 µM sowie 10 µM des Auxintransport-Inhibitor NPA (Katekar und Geissler, 1980). Zusätzlich wurden Keimlinge der Doppelmutante *arf7-1 arf19-1* (Okushima et al., 2005; Weijers et al., 2005) 3 Tage lang in Dunkelheit auf ½ MS-Phytigel angezogen, um deren Phänotyp mit einer NPA-Behandlung zu vergleichen (Abb. 29).

3. 3. 12. Addition von gravitropen und phototropen Reizen bei *agd12-9*

Zu Untersuchungen der Mutante *agd12-9* hinsichtlich einer Addition gravitroper und phototroper Reaktionen wurden Keimlinge von *agd12-9* und Columbia 8 3 Tage auf senkrecht stehenden Platten mit ½ MS-Phytigel angezogen. Anschließend wurden die Keimlinge in einer Strahlteilerbox platziert und diese um einen Winkel von 90° gekippt. Zusätzlich erfolgte eine 24 stündige Bestrahlung mit Blaulicht. Diese erfolgte von oben und traf somit seitlich auf die um 90° inklinierten Keimlinge auf. Zusätzlich wurden entsprechende Dunkelkontrollen für beide Genotypen generieren. Nach einer Versuchsdauer von 8 sowie 24 Stunden wurden die Keimlinge fotografiert. Die resultierenden Krümmungen der Hypokotyle wurden mittels *Imagetool* ermittelt und mit MS Excel bearbeitet und grafisch dargestellt (Abb. 30).

3. 3. 13. Tropismen von *agd12-9* und *ehb1-2* in Abhängigkeit von Ca^{2+}

Zur Klärung der Frage, ob Calcium-Ionen bei der Krümmung eine Rolle spielt, wurden die Mutanten *agd12-9* und *ehb1-2* hinsichtlich ihrer photo- und gravitropen Reaktionen bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen untersucht. Dazu wurden Keimlinge der beiden Mutanten samt ihrer isogenen Wildtypen Columbia 8 und Columbia 3 für 3 Tage auf senkrechten Phytigel-Platten mit Ca^{2+} -Konzentrationen von 10^{-7} M Ca^{2+} bzw. 10^{-3} M Ca^{2+} in Dunkelheit angezogen. Dabei unterschieden sich die Medien hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -Quelle und weiterer Inhaltsstoffe. So beinhaltete das verwendete Ca^{2+} -Minimalmedium neben CaCl_2 als Ca^{2+} -Quelle zusätzlich 2,1 mM MgCl_2 , um eine ausreichende Phytigel-Polymerisation zu garantieren. Optional wurde diesem Ca^{2+} -Minimalmedium 1 % Saccharose beigefügt.

Im Fall des alternativen $\frac{1}{2}$ MS-Phytigel wurden dem Medium alle im herkömmlichen MS-Medium enthaltenen Inhaltsstoffe und Spurenelemente ohne Calcium beigefügt. Die jeweilige Konzentration von 10^{-7} M Ca^{2+} bzw. 10^{-3} M Ca^{2+} wurden mittels CaO eingestellt. Außerdem wurde dem Medium 1,5 mM MgCl_2 zugegeben, um zum einen die Phytigel-Polymerisation zu garantieren. Zum anderen wurde dem Medium so eine alternative Quelle für Chlorid-Ionen beigefügt, welche durch die Abwesenheit von CaCl_2 nur begrenzt vorliegen würden. Dabei sollten die hier eingesetzten Mg^{2+} -Konzentrationen keine negativen Auswirkungen haben, da sie innerhalb eines für *Arabidopsis thaliana* nachgewiesenen Toleranzbereichs von 50 μM bis 5 mM Mg^{2+} lagen (Gebert et al., 2009; Visscher et al., 2010). Platten mit derart angezogenen 3 Tage alten Keimlingen wurden anschließend in verschiedenen Versuchen bezüglich Gravi- und Phototropismus eingesetzt. Die resultierende Hypokotyl- und Wurzel-Krümmung wurde mittels Imagetool bestimmt und durch MS Excel bearbeitet und grafisch dargestellt (Abb. 33 bis Abb. 38).

3. 3. 14. Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der zellulären Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen in *Nicotiana benthamiana* und *Arabidopsis thaliana* erfolgte mittels eines Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskop. Hierfür wurden GFP-Fusionsproteine in pflanzlichen Geweben durch Blaulicht mit $\lambda_{\text{max}} = 488$ nm angeregt. Emittierendes Licht wurde vorab durch den Kurzpass-Interferenzfilter KIF590-Filter geleitet um die Chlorophyll-Autofluoreszenz zu minimieren. Resultierende GFP-Fluoreszenzsignale wurden anschließend in einem Bereich von 505 nm bis 515 nm detektiert. Bei Analyse der BFA-Kompartimente mittels Konfokalmikroskop wurden die Keimlinge vorab eine Stunde mit 10 μM des Membranfarbstoffs FM4-64 sowie 50 μM des Antibiotikums Brefeldin A behandelt. Dabei erfolgte nach Anregung mit Blaulicht die Detektion der FM4-64-Fluoreszenz in einem Bereich von 630 bis 660 nm (Bolte et al., 2004).

3. 3. 15. Unterstützer der praktischer Arbeit

Tabelle 17: Praktischer Beitrag zu den Ergebnissen dieser Arbeit

Name	Art der Unterstützung	Ergebnis
Dr. Michaela Dümmer	konfokale Mikroskopie von <i>A. thaliana</i> inkl. Behandlung mit FM4-64 und BFA A	Abbildung 43
Maike Eckel	konfokale Mikroskopie von Tabak	Abbildung 41 E
Dr. Franz Grolig	konfokale Mikroskopie von Tabak	Abbildung 41 F
Florian Werner	Vorbereitung von Gravitropismus- Experimenten in Abhängigkeit zu CaCl_2	Abbildung 33, Abbildung 35
Dr. Marika Midon	Erstellung von EHB1:GFP-Überexpression	Abbildung 42 D, E, F, Abbildung 43
Prof. Dr. Tomas Werner Prof. Dr. Thomas Schmuelling	Bereitstellung einer 35S::GFP-Kontrolle	Abbildung 42 G
Patrick Förster Chris Dlouhy	Assistenz bei Hefe-Zwei-Hybrid-System	Abbildung 14, Tabelle 19, Tabelle 20

4. Ergebnisse

4. 1. Interaktionsstudien zu AGD12 und EHB1 in Hefe

4. 1. 1. Erstellung von Expressionsvektoren für Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse

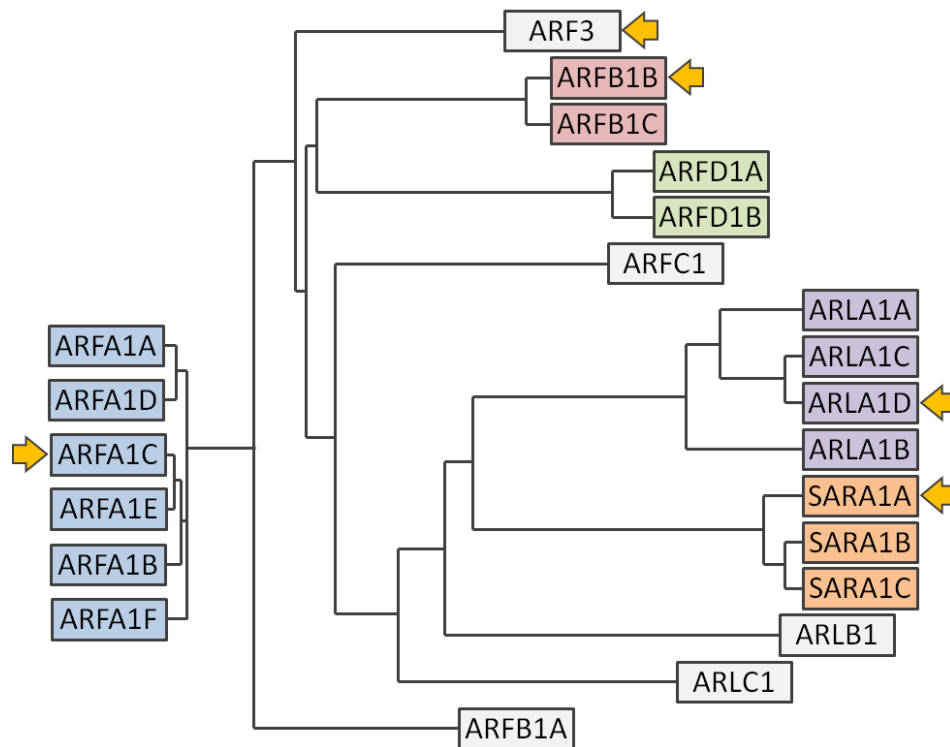


Abbildung 12: Phylogenie ARF-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* mit Kandidatenproteinen

Phylogenetischer Baum der 22 ARF- und ARF-ähnlichen Proteine aus *Arabidopsis thaliana* erstellt mittels Clustal-X und eine daraus resultierende Einteilung der Proteinsequenzen von ARFA1A (AT1G23490.1), ARFA1B (AT5G14670.1), ARFA1C (AT2G47170.1), ARFA1D (AT1G70490.1), ARFA1E (AT3G62290.1), ARFA1F (AT1G10630.1), ARFB1A (AT2G15310.1), ARFB1B (AT5G17060.1), ARFB1C (AT3G03120.1), ARFC1 (AT3G22950.1), ARFD1A (AT1G02440.1), ARFD1B (AT1G02430.1), ARF3 (AT2G24765.1), ARLA1A (AT5G37680.1), ARLA1B (AT3G49860.1), ARLA1C (AT3G49870.1), ARLA1D (AT5G67560.1), ARLB1 (AT5G52210.1), ARLC1 (AT2G18390.1), SARA1A (AT1G09180.1), SARA1B (AT1G56330.1) und SARA1C (AT4G02080.1) in farblich markierten Gruppen, abhängig von ihrer Homologie. Pfeile markieren die aus jeder Gruppe verwendeten Kandidatenproteine für Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid-System.

Der ermittelte Verwandtschaftsgrad der 22 ARF-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* basierte auf der Nomenklatur nach Vernoud et al., 2003. Der daraus resultierende phylogenetische Baum in Abbildung 12 erlaubte eine Einordnung der Proteine in Untergruppen. Bei der Wahl von Kandidatenproteinen, welche auf eine mögliche Interaktion mit AGD12 und EHB1 getestet werden sollten, wurde ein Protein aus jeder Untergruppe ausgewählt. Dabei war ein durch Literatur belegter Bezug zum Photo- bzw. Gravotropismus ein wichtiges Auswahlkriterium. So fiel die Wahl in der Untergruppe der untereinander sehr homologen ARFA-Proteine auf ARFA1C, dessen GTPase-Funktion *in vitro*

durch AGD12 aktiviert wird (Jensen et al., 2000). Zudem spielt es eine Rolle bei der Lokalisation von PIN1 in der Plasmamembran und bei der Auxin-abhängigen Entwicklung der Pflanze (Tanaka et al., 2014). ARF3 kann *in vitro* ebenfalls durch AGD12 aktiviert werden (Jensen et al., 2000). Des Weiteren wurde, aufgrund seiner blaulichabhängigen Interaktion mit Phototropin 1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System, ARFB1B ausgewählt (Sullivan et al., 2009). Aufgrund seiner Lokalisation im Golgi und in der Plasmamembran wurde im Fall ARF-ähnlicher Proteine ARLA1D verwendet (Tanz et al., 2013). Aus der Untergruppe der Sar1p-homologen SAR-Proteine wurde SARA1A für Interaktionsstudien ausgewählt, da es maßgeblich an der Bildung von COPII-Vesikeln beteiligt ist (d'Enfert et al., 1992). Zusammen mit AGD12 und EHB1 wurde die codierende DNA-Sequenz der ausgewählten ARF-Proteine mittels Gateway-Klonierung in Leervektoren pGADT7-GW zur Erzeugung von Beuteplasmiden bzw. in den Levektor pGBKT7-GW zur Erzeugung von Köderplasmiden integriert (Abb. 13 und Tabelle 18).

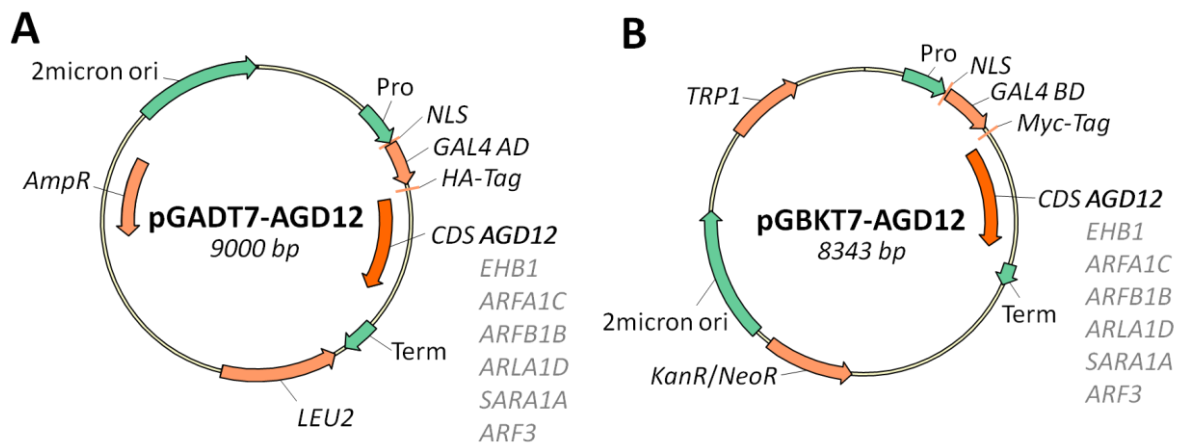


Abbildung 13: Beispiel für Hefe-Zwei-Hybrid-System erstellte Beute- und Köderplasmide

Plasmidkarte des (A) Beuteplasmid pGADT7-AGD12 und (B) Köderplasmid pGBKT7-AGD12 mit den darin enthaltenen Resistenzen gegen Ampicillin (*AmpR*) bzw. Kanamycin/Neomycin (*KanR/NeoR*), Gene zur Synthese der Aminosäuren Leucin (*LEU2*) bzw. Tryptophan (*TRP1*), Replikationsursprung (2 micron-ori), Promotor (Pro) sowie Terminator (Term) der Hefe-Alkoholdehydrogenase 1 *yADH1*, Kernlokalisierungssignal (NLS), Aktivierungsdomäne (*GAL4 AD*) bzw. DNA-Bindedomäne (*GAL4 BD*) des *GAL4*-Transkriptionsfaktors, HA- bzw. Myc-Tag sowie inserierte CDS am Beispiel von *AGD12* (*CDS AGD12*). Letztere variiert je nach verwendetem Kandidatenprotein.

Abbildung 13 zeigt am Beispiel von AGD12 das Zielplasmid nach erfolgreicher Insertion von codierender Sequenz in die Leervektoren pGADT7-GW (Abb. 13A) und pGBKT7-GW (Abb. 13B) durch Gateway-Klonierung. Mit dem Beuteplasmid pGADT7-AGD12 erfolgreich transformierte Mikroorganismen konnten im Fall von *E. coli* über Ampicillin mittels *AmpR*-Gen bzw. im Fall von *S. cerevisiae* über Leucin-Defizit mittels *LEU2*-Gen selektioniert werden. Zudem erlaubte pGADT7-AGD12 unter Kontrolle des *yADH1*-Promotors die Expression und Synthese eines Fusions- bzw. Beuteproteins mit NLS, *GAL4*-Aktivierungsdomäne und AGD12, welches über einen beigefügten HA-Tag nachgewiesen werden kann.





















































































Beim Köderplasmid pGBKT7-AGD12 hingegen erfolgte eine Selektion in *E. coli* über Kanamycin mittels *KanR*-Gen und in *S. cerevisiae* über Kompensation des vorhandenen Tryptophan-Defizits mittels *TRP1*-Gen. In Hefe bedingte pGBKT7-AGD12 unter Kontrolle des *yAHD1*-Promotors die Expression und Synthese eines Fusions- bzw. Köderproteins mit NLS, GAL4-Bindedomäne und AGD12, welches über einen beigefügten Myc-Tag nachgewiesen werden kann. Aus parallel erfolgter Gateway-Klonierung resultierten ähnliche Plasmide mit jeweiliger CDS von *AGD12*, *EHB1* und den zuvor nominierten *ARF*-Genen (Tabelle 18).

Tabelle 18: Erstellte Beute- und Köderplasmide für Hefe-Zwei-Hybrid-System

Gen/CDS	Beuteplasmid	Köderplasmid
<i>AGD12</i> (AT4G21160)	pGADT7-AGD12	pGBKT7-AGD12
<i>EHB1</i> (AT1G70800)	pGADT7-EHB1	pGBKT7-EHB1
<i>ARFA1C</i> (AT2G47170)	pGADT7-ARFA1C	pGBKT7-ARFA1C
<i>ARFB1B</i> (AT5G17060)	pGADT7-ARFB1B	pGBKT7-ARFB1B
<i>ARLA1D</i> (AT5G67560)	pGADT7-ARLA1D	pGBKT7-ARLA1D
<i>SARA1A</i> (AT1G09180)	pGADT7-SARA1A	pGBKT7-SARA1A
<i>ARF3</i> (AT2G24765)	pGADT7-ARF3	pGBKT7-ARF3

4. 1. 2. Interaktionsanalysen auf *Dropout-Medium*

Tabelle 19: Hefewachstum auf *Dot-Platten* mit *Double (DD)* und *Quadruple (QD)* *Dropout Medium*

Beute	Köder	DD	QD	Beute	Köder	DD	QD
AGD12	ARFA1C			ARFA1C	AGD12		
AGD12	ARFB1B			ARFB1B	AGD12		
AGD12	ARLA1D			ARLA1D	AGD12		
AGD12	SARA1A			SARA1A	AGD12		
AGD12	ARF3			ARF3	AGD12		
EHB1	ARFA1C			ARFA1C	EHB1		
EHB1	ARFB1B			ARFB1B	EHB1		
EHB1	ARLA1D			ARLA1D	EHB1		
EHB1	SARA1A			SARA1A	EHB1		
EHB1	ARF3			ARF3	EHB1		
AGD12	EHB1			EHB1	AGD12		
AGD12	AGD12			EHB1	EHB1		
AGD12	/			/	AGD12		
EHB1	/			/	EHB1		
/	ARFA1C			ARFA1C	/		
/	ARFB1B			ARFB1B	/		
/	ARLA1D			ARLA1D	/		
/	SARA1A			SARA1A	/		
/	ARF3			ARF3	/		
T-antigen	p53			T-antigen	/		
/	p53			/	/		

Die in Tabelle 19 dargestellten Interaktionsstudien auf *Dot*-Platten wiesen im Fall von zu testenden Interaktionen zwischen AGD12, EHB1 und ARF-Proteinen ein komplementäres Resultat auf. So zeigten Hefeklone mit AGD12 als Beuteprotein und ARFs als Köderproteine kein Wachstum auf QD-Medium. Im Fall von AGD12 als Köderprotein hingegen lassen diese Hefen Wachstum in Kombination mit allen ARFs sowie bei der dazugehörigen AGD12-Negativkontrolle erkennen. Ähnlich verhielt es sich bei Hefeklonen mit EHB1. Dabei zeigte sich jedoch bei Hefeklonen mit EHB1 als Köderprotein kein Wachstum in Kombination mit ARFs auf QD-Medium. Wurde EHB1 dagegen als Beuteprotein eingesetzt, kam es zu einem Wachstum bei Kombinationen mit ARF-Proteinen sowie bei der dazugehörigen EHB1-Negativkontrolle. Einzig im Fall von ARLA1D als Köderprotein war kein Hefewachstum zu verzeichnen. Bei Interaktionsstudien von AGD12 und EHB1 untereinander, bei denen AGD12 bzw. EHB1 mit sich selbst interagieren sollten, kam es in beiden Fällen zu Wachstum. Ebenso wenn EHB1 als Beute- und AGD12 als Köderprotein fungierte. Nur im umgekehrten Fall, bei dem AGD12 als Beute- und EHB1 als Köderprotein eingesetzt wurde, kam es zu keinem Hefewachstum.

Tabelle 20: Hefewachstum auf Ausstrichplatten mit *Triple* (TD), *Quadruple* (QD) und *Quadruple Dropout Medium* mit 200 ng/ml Aureobasidin A (QD+AbA) nach 2 d / 5 d Inkubation bei 29 °C

Beute	Köder	TD	QD	QD+AbA	Beute	Köder	TD	QD	QD+AbA
AGD12	ARFA1C	- / -	- / -	- / -	ARFA1C	AGD12	++ / +++	- / +++	- / +
AGD12	ARFB1B	- / -	- / -	- / -	ARFB1B	AGD12	++ / +++	- / +++	- / ++
AGD12	ARLA1D	- / -	- / -	- / -	ARLA1D	AGD12	++ / +++	- / +++	- / ++
AGD12	SARA1A	- / -	- / -	- / -	SARA1A	AGD12	++ / +++	- / +++	- / ++
AGD12	ARF3	- / -	- / -	- / -	ARF3	AGD12	++ / +++	- / +++	- / ++
EHB1	ARFA1C	++ / +++	- / +++	- / +	ARFA1C	EHB1	- / -	- / -	- / -
EHB1	ARFB1B	++ / +++	+ / +++	+ / +++	ARFB1B	EHB1	- / -	- / -	- / -
EHB1	ARLA1D	- / ++	- / -	- / -	ARLA1D	EHB1	- / -	- / -	- / -
EHB1	SARA1A	++ / +++	- / +++	- / +	SARA1A	EHB1	- / -	- / -	- / -
EHB1	ARF3	++ / +++	- / +++	- / +	ARF3	EHB1	- / -	- / -	- / -
AGD12	EHB1	- / -	- / -	- / -	EHB1	AGD12	++ / +++	++ / +++	++ / +++
AGD12	AGD12	++ / +++	- / +++	- / ++	EHB1	EHB1	++ / +++	- / ++	- / +
AGD12	/	- / -	- / -	- / -	/	AGD12	++ / +++	- / +++	- / ++
EHB1	/	++ / +++	+ / +++	- / ++	/	EHB1	- / -	- / -	- / -
/	ARFA1C	- / -	- / -	- / -	ARFA1C	/	- / +	- / -	- / -
/	ARFB1B	- / -	- / -	- / -	ARFB1B	/	- / ++	- / -	- / -
/	ARLA1D	- / -	- / -	- / -	ARLA1D	/	- / ++	- / -	- / -
/	SARA1A	- / -	- / -	- / -	SARA1A	/	- / +	- / -	- / -
/	ARF3	- / -	- / -	- / -	ARF3	/	- / +	- / -	- / -
T-antigen	p53	++ / +++	++ / +++	++ / +++	T-antigen	/	- / -	- / -	- / -
/	p53	- / -	- / -	- / -	/	/	- / -	- / -	- / -

Die in Tabelle 20 dargestellten Ergebnisse der Ausstrichplatten deckten sich mit denen aus Tabelle 19. Zudem zeigten sich Unterschiede beim Hefewachstum als Folge der Abstufungen des Selektionsdrucks und der Inkubationszeit. So zeigten alle Hefeklone im Vergleich zum QD-Medium ein stärkeres Wachstum auf TD-Medium bzw. ein geringeres Wachstum in Anwesenheit von Aureobasidin A. Dies führte mitunter zu moderatem Wachstum von Negativkontrollen auf TD-Medium sowie zu fehlendem Wachstum einiger Klone als Folge einer nur 2 Tage andauernden Inkubation.

Verglichen mit den Ergebnissen von Tabelle 19 zeigten sich hier bei erhöhtem Selektionsdruck durch Aureobasidin A bezüglich einer möglichen Interaktion von AGD12 mit ARFs keine neuen Erkenntnisse. So war das Wachstum bei Hefeklonen mit einem ARF als Beuteprotein ähnlich moderat wie bei der dazugehörigen AGD12-Negativkontrolle. Einzig in Kombination mit ARFA1C als Beuteprotein wuchs der Hefeklon vergleichsweise geringer. Zudem fiel das Hefewachstum im Fall von Hefeklonen mit AGD12 als Beuteprotein auch hier komplett aus. Hefeklone mit EHB1 als Beuteprotein zeigten dagegen ein moderates Wachstum, sowohl in Kombination mit ARF-Proteinen als auch bei der dazugehörigen EHB1-Negativkontrolle mit leerem Köderplasmid. Einzig im Fall von ARFB1B in der Rolle des Köderproteins zusammen mit EHB1 als Beuteprotein kam es selbst bei hohem Selektionsdruck zu starkem Hefewachstum auf dem Niveau der Positivkontrolle T-antigen/p53. Komplementär dazu wiesen Hefeklone mit EHB1 als Köderprotein ebenso kein Wachstum auf. Zudem zeigte sich erneut bei Hefeklonen, bei denen AGD12 und EHB1 mit sich selbst interagieren sollten, ein moderates Hefewachstum sowie ein starkes Wachstum wenn EHB1 als Beute- und AGD12 als Köderprotein fungierten. Im umgekehrten Fall zeigte sich dagegen keinerlei Wachstum.

Zusammenfassend ergaben sich im Fall von AGD12 sowie EHB1 Indizien für eine Interaktion mit unterschiedlichen ARFs. Darunter die Kombination EHB1 mit ARFB1B mit starkem Wachstum bei höchstmöglichem Selektionsdruck. Jedoch zeigten auch Negativkontrollen von sowohl AGD12 als auch EHB1 ein zum Teil beträchtliches Wachstum bzw. Autoaktivität.

4. 1. 3. Interaktionsanalysen mit α -Galaktosidase-Assay

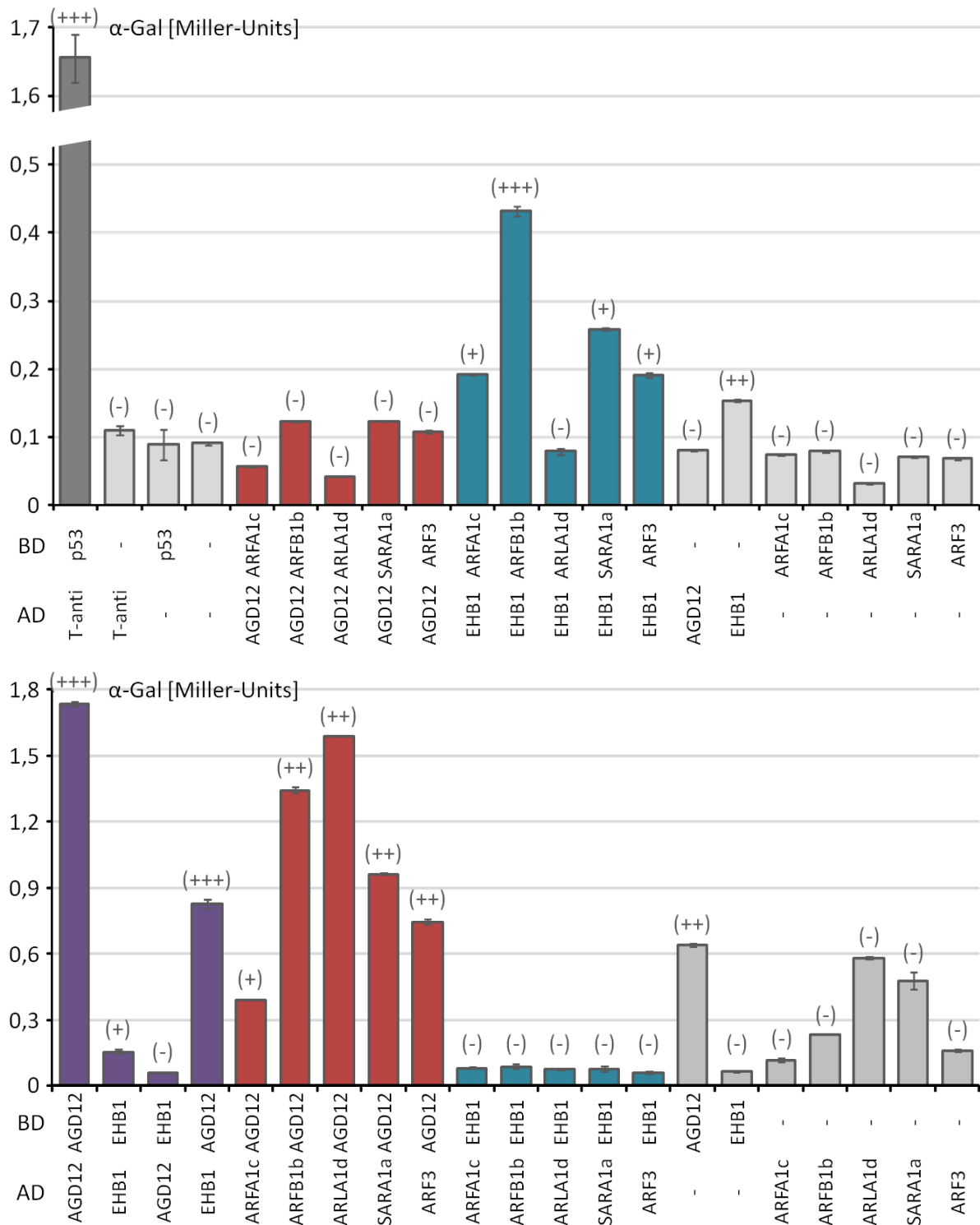


Abbildung 14: α -Galaktosidase-Assay zur Interaktion zwischen AGD12, EHB1 und ARF-Proteinen

Quantifizierung der α -Galaktosidase in Miller-Units im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit zu untersuchenden Proteininteraktionen zwischen AGD12 und ARF-Proteinen (rot), EHB1 mit ARF-Proteinen (blau), AGD12 und EHB1 untereinander (violett) sowie dazugehörigen Positiv- und Negativkontrollen (grau). Getestete Proteine sind als Köder mit DNA-Bindedomäne (BD) sowie auch als Beute mit Aktivierungsdomäne (AD) bezeichnet. Abgebildete Mittelwerte aus Triplikaten sind mit Standardfehlern versehen. Zusätzlich Angabe der Stärke des Hefewachstums von (-) bis (+++) nach 5 Tagen auf *Quadruple Dropout* Medium mit 200 ng/ml Aureobasidin A aus Tabelle 20.

Abbildung 14 stellt die Quantifizierung von α -Galaktosidase bei verschiedenen Hefeklonen nach Goddard et al. 2005 dar. Angelehnt an die Interaktionsstudien auf *Dropout*-Medium zeigte sich, dass Hefeklone mit AGD12 als Beuteprotein bzw. EHB1 als Köderprotein im Test mit ARF-Proteinen mit 0,1 Miller-Units eine sehr geringe α -Galaktosidase-Aktivität auf dem Niveau der Negativkontrolle aufweisen.

Hefeklone mit EHB1 als Beute- und ARFs als Köderproteine zeigten dagegen fast durchgängig höhere Aktivitäten. Zudem wies die dazugehörige EHB1-Negativkontrolle ohne Köderprotein eine vergleichbare α -Galaktosidase-Aktivität auf. Einzig Hefen mit ARLA1D und ARFB1B als Köderprotein wichen davon ab. So zeigte sich im Fall von ARLA1D eine sehr geringe α -Galaktosidase-Aktivität, vergleichbar mit dem Niveau der übrigen Negativkontrollen. Hefen mit ARFB1B als Köderprotein hingegen zeigten mit über 0,4 Miller-Units eine Aktivität, welche weit über der der anderen Hefeklone mit EHB1 als Beuteprotein lag.

Im Fall von AGD12 als Köderprotein in Kombination mit ARF-Proteinen zeichneten sich noch höhere Werte ab. So wiesen nahezu alle betreffenden Hefeklone eine weit höhere Aktivität auf als Hefeklone mit EHB1 in Kombination mit ARF-Proteinen. Dabei zeigte die Kombination von AGD12 mit ARFB1B bzw. ARLA1D mit einem Ergebnis von über 1 Miller-Unit ein Niveau nahe der Positivkontrolle p53/T-antigen. Verglichen damit zeigten Hefeklone mit SARA1A und ARF3 als Beuteproteine in Kombination mit AGD12 moderate Aktivitäten. Wogegen Hefen mit AGD12 und ARFA1C mit 0,4 Miller-Units eine Aktivität unterhalb der dazugehörigen AGD12-Negativkontrolle aufwiesen. So zeigten die Negativkontrollen von AGD12, ARLA1D und SARA1A in Kombination mit Leervektoren α -Galaktosidase-Aktivitäten von über 0,5 Miller-Units.

Bei Hefeklonen mit denen die Interaktion von AGD12 und EHB1 untereinander untersucht werden sollte zeigte sich bei einer Kombination bei der AGD12 als Beute- und Köderprotein fungierte eine extrem starke α -Galaktosidase-Aktivität. Dabei übertraf diese mit 1,7 Miller-Units sogar die Positivkontrolle p53/T-antigen. Eine Kombination mit EHB1 in der Rolle des Beute- und Köderproteins sowie die Kombination aus AGD12 als Beute- und EHB1 als Köderprotein zeigten dagegen kaum Aktivität. Die umgekehrte Kombination mit EHB1 als Beute- und AGD12 als Köderprotein resultierte hingegen in einer vergleichsweise moderaten α -Galaktosidase-Aktivität.

Schlussendlich deckten sich die Resultate des α -Galaktosidase-Assay größtenteils mit dem zuvor dargestellten Wachstum auf Selektionsmedium. So zeigte EHB1 und vor allem AGD12 Indizien für eine Proteininteraktion mit verschiedenen ARFs, wobei vor allem ARFB1B hervorstach. Die in diesem Assay stärkste gemessene α -Galaktosidase-Aktivität deutete zudem auf eine Dimerisierung von AGD12 hin.

4. 2. Aufbau und Expression der AGD-Proteine in *Arabidopsis thaliana*

4. 2. 1. Phylogenie der AGD-Proteine

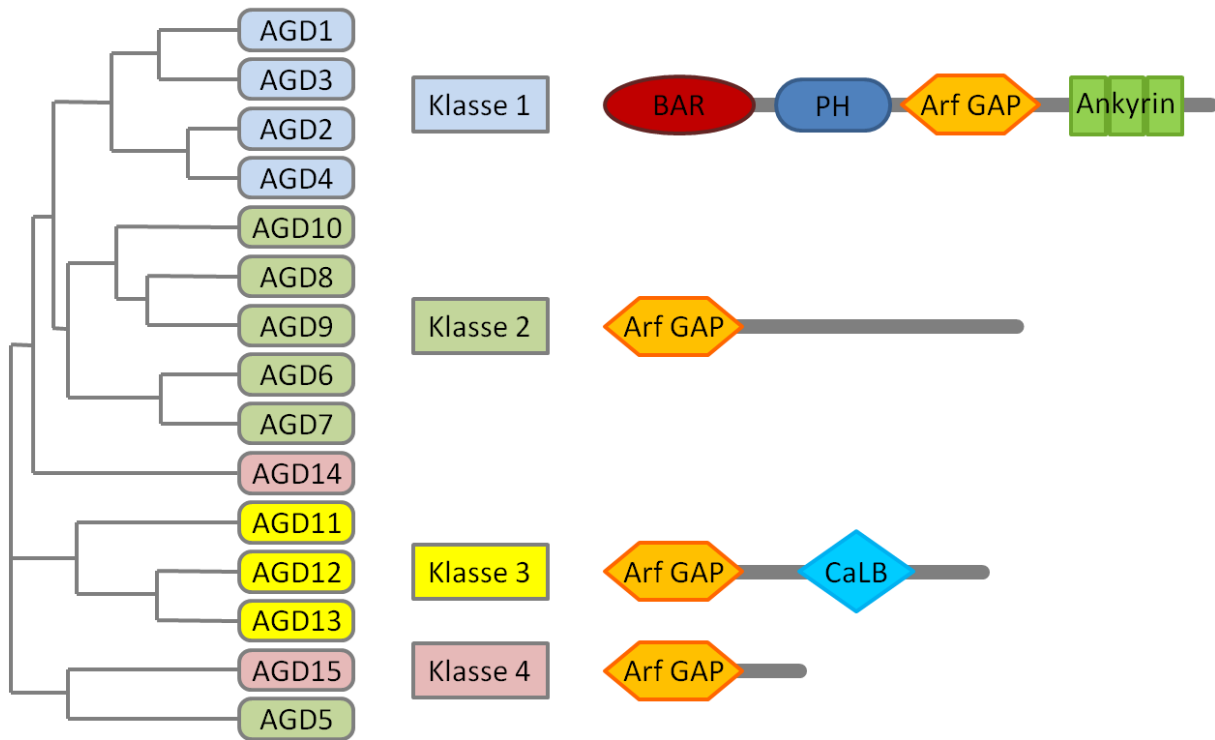


Abbildung 15: Phylogenie und Klassifizierung der AGD-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*

Phylogenetischer Baum der AGD-Proteine als Ergebnis vergleichender Sequenzanalyse der Proteine AGD1 (AT5G61980.1), AGD2 (AT1G60860.1), AGD3 (AT5G13300.1), AGD4 (AT1G10870.1), AGD5 (AT5G54310.1), AGD6 (AT3G53710.1), AGD7 (AT2G37550.1), AGD8 (AT4G17890.1), AGD9 (AT5G46750.1), AGD10 (AT2G35210.1), AGD11 (AT3G07490.1), AGD12 (AT4G21160.1), AGD13 (AT4G05330.1), AGD14 (AT1G08680.1) und AGD15 (AT3G17660.1) mittels Clustal-X sowie die Einteilung der Proteine in die Klassen 1 bis 4. Daneben sind schematische Darstellungen des Proteinaufbaus der AGD-Klassen 1 bis 4 anhand von SMART-Analysen mit BAR-, PH-, Ankyrin-, CaLB-, und Arf-GAP-Domänen abgebildet.

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis vergleichender Sequenzanalyse der Proteine AGD1 bis AGD15 mittels Clustal-X. Der daraus resultierende phylogenetische Baum verdeutlicht unterschiedlich starke Übereinstimmungen zwischen den Proteinen und deckt sich größtenteils mit der Einordnung der AGD-Proteine in die Klassen 1 bis 4 nach Vernoud et al., 2003 abhängig von deren Aufbau bzw. Proteindomänen.

Dabei zeigt sich, dass AGD-Proteine der Klasse 1 mit BAR-, PH-, Ankyrin- und Arf-GAP-Domänen das höchste Aufkommen unterschiedlicher Domänen haben und die Arf-GAP-Domänen hierbei zentral in der Proteinsequenz vorzufinden sind. AGD-Proteine der Klassen 2, 3 und 4 hingegen weisen je eine Arf-GAP-Domäne am N-Terminus der Sequenz auf. Dabei besitzen die Klassen 2 und 4 lediglich eine Arf-GAP-Domäne und unterscheiden sich untereinander vornehmlich anhand unterschiedlicher Sequenzlängen. Proteine der Klasse 3 bzw. AGD11, 12 und 13 weisen hingegen als einzige eine zusätzliche CaLB-Domäne nahe des C-Terminus auf.

4. 2. 2. *AGD*-Expression in Abhängigkeit von Licht

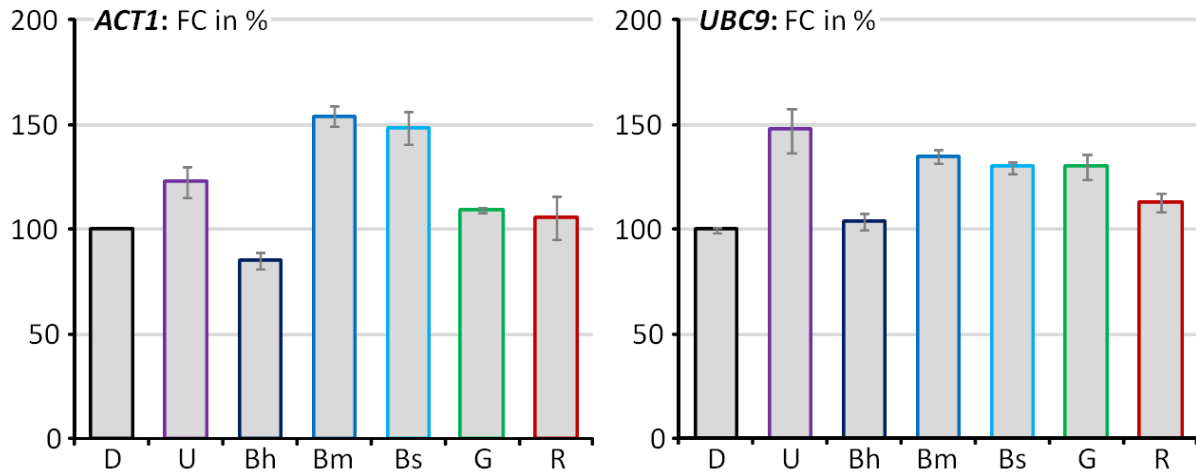


Abbildung 16: Expression der Referenzgene *ACT1* und *UBC9* in Abhängigkeit verschiedener Lichtbedingungen
 Ergebnisse quantitativer PCR gegen Transkripte der Referenzgene *ACT1* (AT2G37620) und *UBC9* (AT4G27960) bei 4 Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen, gewachsen in Dunkelheit (D); 0,1 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ UV-Licht (U); 10 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Blaulicht (Bh); 0,1 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Blaulicht (Bm); 0,001 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Blaulicht (Bs); 0,1 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Grünlicht (G) oder 0,1 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Rotlicht (R) in Relation zur Dunkelkontrolle. *fold change* (FC) in % mit Standardfehler.

Im weiteren Verlauf der Arbeit galt es die 15 *AGD*-Gene auf eine mögliche lichtabhängige Expression hin zu untersuchen. Dazu wurden im Vorfeld die Expression von Referenzgenen bei den verschiedenen verwendeten Lichtbedingungen mittels quantitativer PCR untersucht. Abbildung 16 stellt die *fold change* bei *ACT1*- bzw. *UBC9*-Transkripten als Folge unterschiedlicher Belichtung in Relation zu Dunkelkontrollen dar. Dabei zeigte sich, dass bei beiden Genen nach viertägiger Belichtung Abweichungen zur Dunkelkontrolle vorlagen. So zeigten in beiden Fällen die Proben aus UV-Licht (U), moderatem (Bm) und schwachem (Bs) Blaulicht erhöhte Transkriptmengen bis über 150 % der Dunkelkontrolle. Zudem wurde deutlich, dass Proben lichtbehandelter Keimlinge allgemein höhere Transkriptmengen im Vergleich zur Dunkelkontrolle (D) aufwiesen. Einzig Proben mit Blaulicht hoher Fluenzraten (Bh) zeigten eine leicht reduzierte bzw. keine gesteigerte Transkriptmenge. Letztlich ließ der Vergleich beider Transkripte eine homogenere Verteilung von *UBC9* bei verschiedenen Lichtbedingungen erkennen. Daher wurde *UBC9* als Referenzgen zur Berechnung der relativen *fold change* der *AGD*-Transkripte hinzugezogen (Abb. 17).

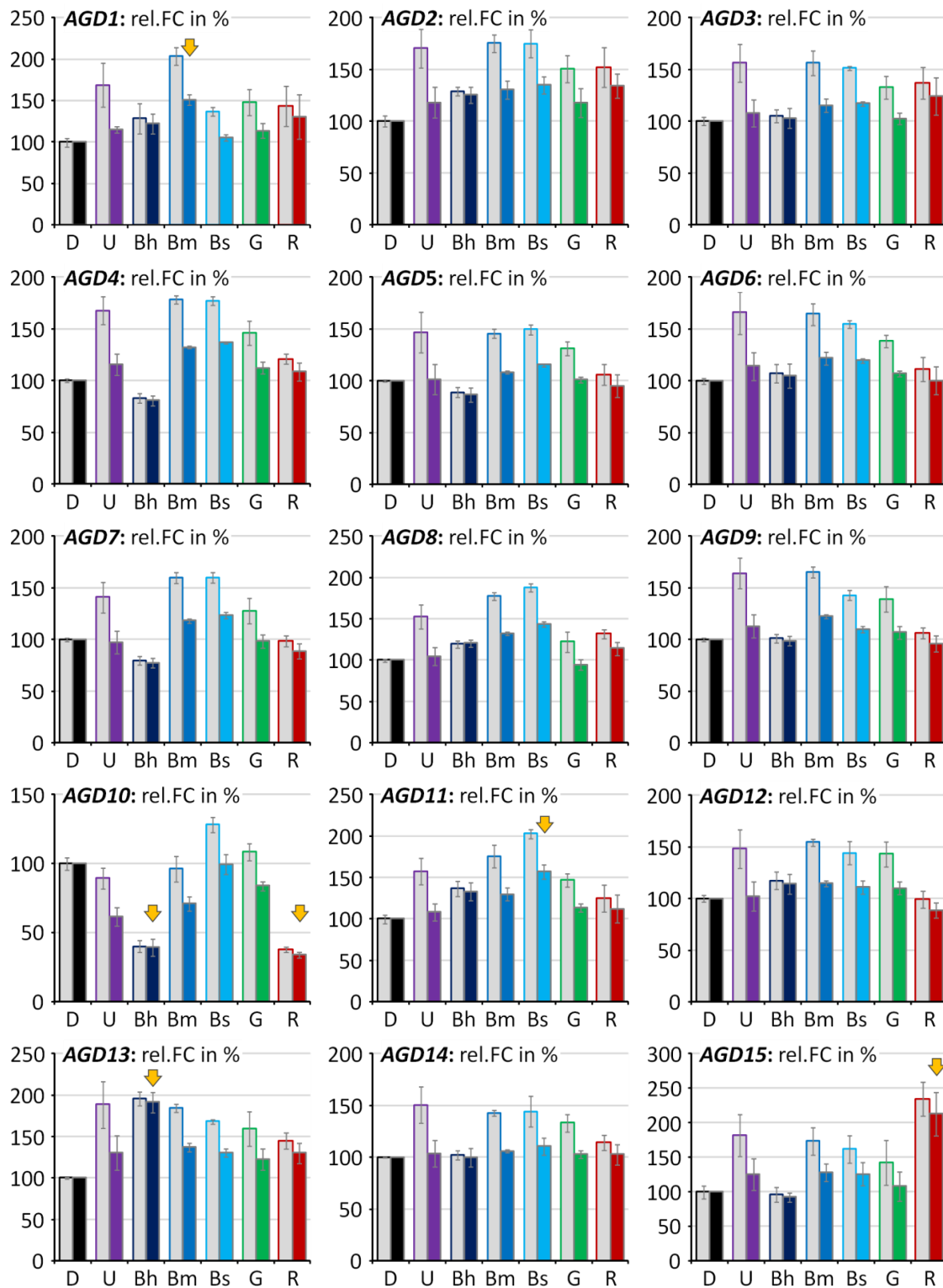


Abbildung 17: Expression der AGD-Gene in Abhängigkeit verschiedener Lichtbedingungen

Ergebnisse quantitativer PCRs der 15 AGD-Transkripte welche aus 4 Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen, gewachsen in Dunkelheit (D); 0,1 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ UV-Licht (U); 10 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Blaulicht (Bh); 0,1 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Blaulicht (Bm); 0,001 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Blaulicht (Bs); 0,1 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Grünlicht (G) oder 0,1 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ Rotlicht (R) isoliert wurden. Fold change (FC) in % der Transkript-Mengen in Relation zur Dunkelkontrolle sind als graue Balken dargestellt. Daraus resultierende relative fold changes (rel.FC) in Relation zum Referenz *UBC9* sind als farbige Balken dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. Pfeile verweisen auf Abweichungen relativer fold change (rel.FC) um $\pm 50\%$ von der Dunkelkontrolle hin.

Abbildung 17 zeigt die *fold change* und relative *fold change* der Transkripte von *AGD1* bis *AGD15* als Folge unterschiedlicher Belichtung von Keimlingen im Vergleich zur Dunkelkontrolle. Dabei zeigte sich, dass die *fold change* und relative *fold change* nach Belichtung mehrheitlich höher lagen als die der Dunkelkontrolle. Zudem fiel die relative *fold change* aller Messungen durch Einbeziehung des Referenzgens *UBC9* stets geringer als die entsprechende *fold change* aus. Im Speziellen zu erwähnen sind starke Abweichungen der relativen *fold change* um 50 % bei belichteten Keimlingen im Vergleich zur relativen *fold change* der jeweiligen Dunkelkontrolle. So zeigten die Gene *AGD1* bei moderatem Blaulicht (Bm), *AGD11* bei schwachem Blaulicht (Bs), *AGD13* bei starkem Blaulicht (Bh) und *AGD15* bei Rotlicht (R) eine stark erhöhte Transkriptmenge von über 150 %. Die Werte für *AGD10* hingegen waren nach Belichtung mit starkem Blaulicht (Bh) sowie Rotlicht (R) um weit mehr als 50 % reduziert. So zeigte sich abschließend, dass *AGD11* und *AGD13* nach Belichtung mit Blaulicht eine Erhöhung ihrer Transkriptmenge aufwiesen. Im Fall von *AGD12* war eine derartige Reaktion auf unterschiedliche Belichtungen nicht zu erkennen.

4. 2. 3. Promotor-Analyse der Gene *AGD11*, *AGD12*, *AGD13* und *EHB1*

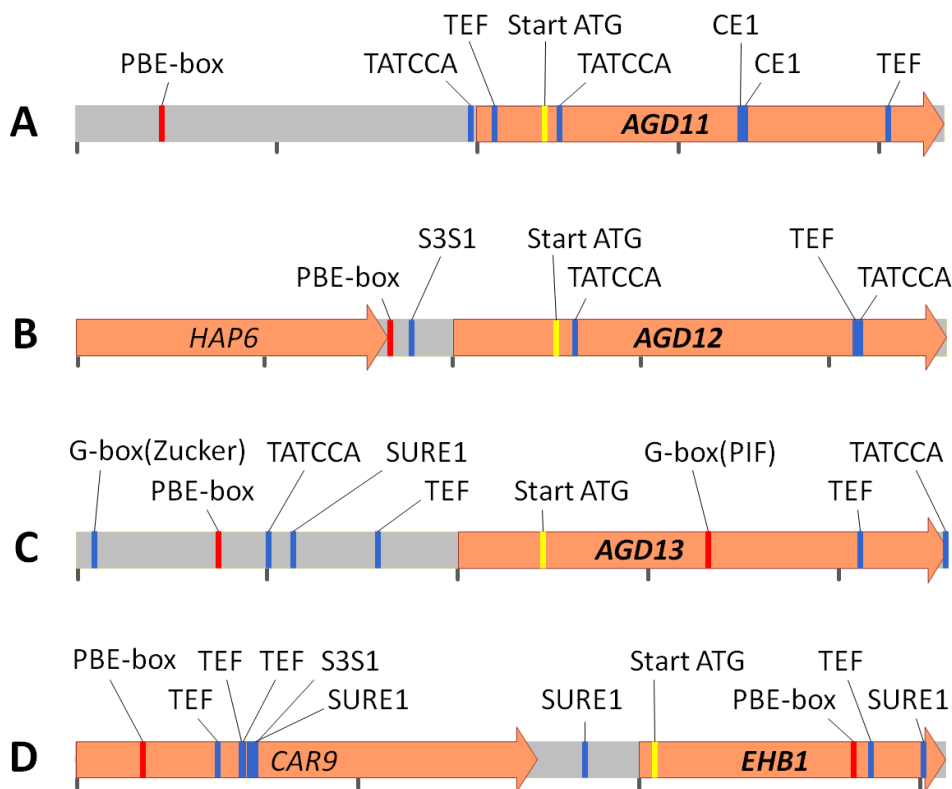


Abbildung 18: Promotor-Analyse der Gene *AGD11*, *AGD12*, *AGD13* und *EHB1*

Schematische Darstellung der Gene (A) *AGD11* (AT3G07940), (B) *AGD12* (AT4G21160), (C) *AGD13* (AT4G05330) und (D) *EHB1* (AT1G70800) mit potentiellen Promotor-Bereichen von 2000 bp Länge, inklusive der angrenzenden Gene (B) *HAP6* und (D) *CAR9*. Neben Translationsstart (gelb) sind Promotor-Elemente für Zucker- (blau) und phytochromabhängige (rot) Transkription markiert. Abstandsmarkierungen entsprechen 1000 bp. Sequenzanalyse und Darstellung erfolgte mittels Vector NTI. Publiziert in Dümmer et al., 2016a (Figure 1).

Die schematischen Darstellungen zur Promotoranalyse der Gene *AGD11*, *AGD12*, *AGD13* und *EHB1* in Abbildung 18 zeigen DNA-Motive in Verbindung mit Zucker- und Phytochrom-assoziiierter Transkription. Dabei war bei allen Genen ein PBE-Box-Motiv im potentiellen Promotor-Bereich von je 2000 bp vor dem jeweiligen Gen zu finden. Im Fall von *EHB1* lag die PBE-Box innerhalb des vorgelagerten Gens *CAR9* (AT1G70790). Zudem war ein weiteres PBE-Box Motiv im Bereich der *EHB1*-Sequenz vorzufinden. Als ein zusätzliches Phytochrom-assoziiertes DNA-Motiv war eine G-Box für Phytochrom-Interaktionsfaktoren (PIFs) im Bereich des Gens *AGD13* auszumachen. Zudem war, ähnlich wie im Fall von *EHB1*, im Promotorbereich von *AGD12* mit *HAP6* (AT4G21150) ebenfalls ein zusätzliches Gen vorhanden.

In Bezug auf zuckerassoziierte DNA-Motive trat vor allem der cis-Promotorbereich von *EHB1* hervor. So traten ca. 1500 bp oberhalb der codierenden Sequenz die Motive TEF, SURE1 und S3S1 überdurchschnittlich gehäuft auf. Ein derartiger Cluster an DNA-Motiven war dagegen bei *AGD11*, *AGD12* oder *AGD13* nicht vorhanden. Jedoch wiesen auch diese Gene einige zuckerassoziierte DNA-Motive im Promotorbereich auf.

4. 3. Charakterisierung der Mutante *agd12-9*

4. 3. 1. Verifizierung der Mutante *agd12-9*

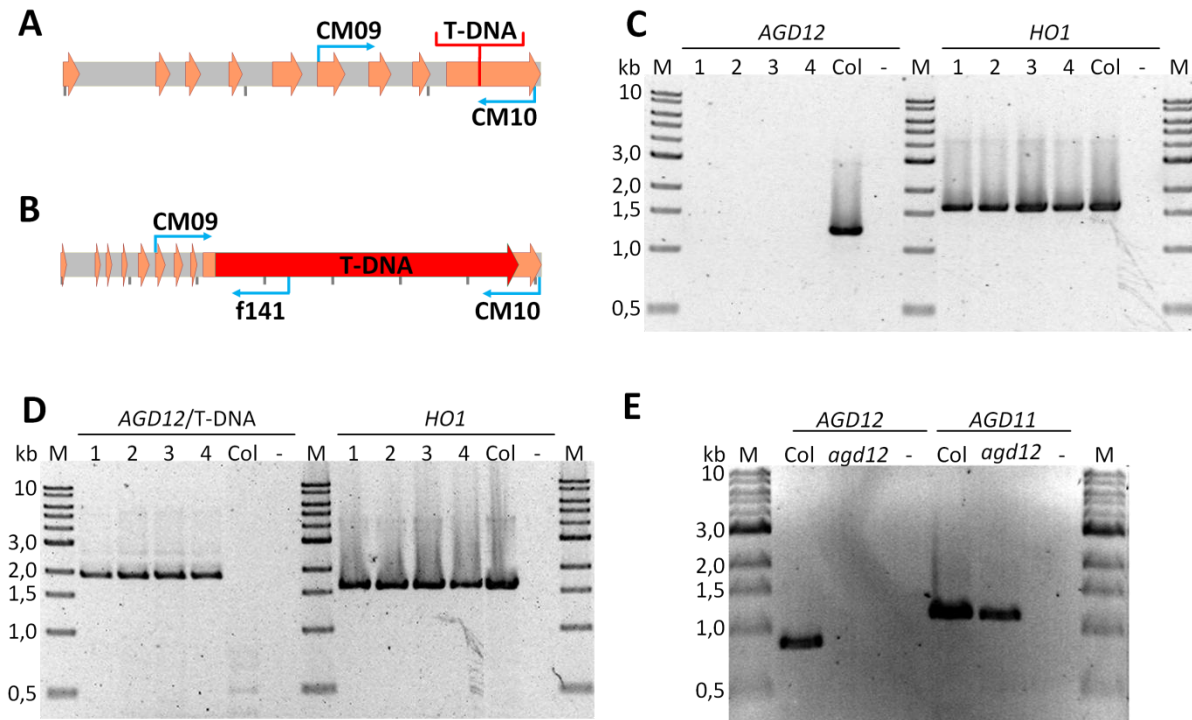


Abbildung 19: Verifizierung der Mutante *agd12-9* durch reverse Transkription und PCR

Schematische Darstellung des *AGD12*-Gens (AT4G21160) in *A. thaliana* mit neun Exons (orange), untranslatierten Bereichen (grün), Primerbindestellen (blau) und T-DNA-Insertion (rot) für (A) Wildtypgen sowie (B) die Linie SALK_036350C mit prognostizierter T-DNA-Insertion innerhalb des *AGD12*-Gens. Größenskala durch Markierungen (grau) je 1000 bp. Agarose-TBE-Gele mit (C) Nachweis des *AGD12*-Wildtypgens (Primer CM09/CM10; 1186 bp), (D) Nachweis der linken Seite der prognostizierten T-DNA-Insertion in *AGD12* (Primer CM09/f141; 1962 bp) bei genomischer DNA von vier *agd12-9*-Pflanzen (B1.1; B1.2; B1.3; B1.4) sowie des Columbia Wildtyps, (C, D) Nachweis des *HO1*-Genes (AT2G26670) mittels PCR (Primer Üff1/Üff2; 1557 bp) als Positivkontrolle, sowie (E) Nachweis des *AGD12*-Transkripts (AT4G21160.1) bei Wildtyp Columbia und Mutante *agd12-9* (B1.4) mittels RT-PCR (Primer CM09/CM10; 848 bp) inklusive Nachweis des *AGD11*-Transkripts (AT3G07940.1) mittels RT-PCR (Primer CM19/CM20; 1144 bp) als Positivkontrolle.

Abbildung 19A und B zeigen die prognostizierte Position und Größe der T-DNA-Insertion innerhalb des neunten Exon von *AGD12* (AT4G21160). Wie in Abbildung 19C dargestellt, war das *AGD12*-Wildtypgen nur im Wildtyp Columbia nachweisbar. Alle vier putativen *agd12*-Mutanten zeigten dagegen kein Amplifikat für *AGD12*. Die PCR in Abbildung 19D mit den Primern CM09 (genspezifisch) und f141 (insertionsspezifisch) zeigte hingegen ein PCR-Produkt bei allen vier putativen *agd12*-Mutanten, nicht jedoch für den Wildtyp Columbia. Im Fall der Positivkontrolle gegen *HO1* in Abbildung 19C und D war stets ein erwartetes PCR-Produkt zu erkennen, welches bei allen Negativkontrollen ohne Template ausblieb. Somit konnten Degradation genomischer DNA sowie unspezifische PCR-Produkte als Ursache dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden. Bei der in Abbildung 19E dargestellten PCR gegen das Transkript von *AGD12* zeigte nur der Wildtyp Columbia ein positives Signal. Folglich konnte für die untersuchte *agd12*-Mutante B1.4 kein vollständiges Transkript von *AGD12* nachgewiesen werden. Der Nachweis eines *AGD11*-Transkripts zur Kontrolle verwendeter cDNA war dagegen bei beiden Pflanzen erfolgreich. Somit konnte die Qualität der verwendeten cDNA nicht als Ursache für eine

fehlende *AGD12*-Amplifikation gesehen werden. Die Negativkontrollen ohne cDNA zeigten im Fall beider PCRs kein Amplifikat.

Folglich konnte für alle vier Pflanzen der Linie SALK_036350C kein *AGD12*-Wildtypgen jedoch eine T-DNA-Insertion in *AGD12* nachgewiesen werden. Die Insertion konnte zudem als homozygot betrachtet werden. Der abschließend ausbleibende Nachweis eines *AGD12*-Transkripts bei SALK_036350C zeigte, dass die nachgewiesene homozygote T-DNA-Insertion im neunten Exon eine korrekte Transkription von *AGD12* unterbindet. Die betreffende Pflanze B1.4 und deren Nachkommen wurden als Mutante *agd12-9* bezeichnet und physiologisch untersucht.

4. 3. 2. Längenwachstum der Mutante *agd12-9*

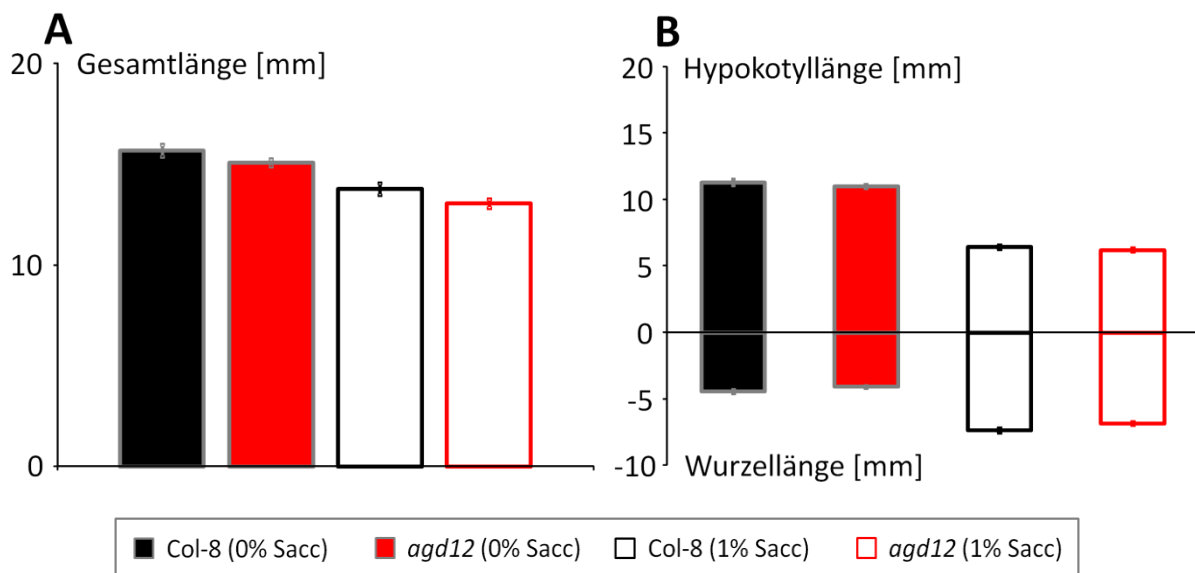


Abbildung 20: Längenbestimmung bei Keimlingen von *agd12-9* und Columbia 8

Bestimmung der (A) Gesamtlänge sowie (B) Hypokotyl- und Wurzellänge 4 Tage alter etiolierter Keimlinge von *agd12-9* und Columbia 8, gewachsen auf ½ MS-Phytigel mit 1% Saccharose bzw. ohne Saccharose. Mittelwerte von je 64 bis 74 Keimlingen wurden mit ImageJ bestimmt und mit Standardfehler versehen. Publiziert in Dümmer et al., 2016a (Figure 5b).

Die in Abbildung 20A dargestellten Gesamtlängen 3 Tage alter Keimlinge von Columbia 8 und *agd12-9* wiesen lediglich geringe Schwankungen in Abhängigkeit zu Genotyp und Saccharose auf. So zeigte die Mutante *agd12-9* im Vergleich zum Wildtyp Columbia 8 eine leicht reduzierte Gesamtlänge. Zudem wiesen beide Linien in Anwesenheit von 1 % Saccharose eine leichte Reduktion ihrer Gesamtlänge auf. Dagegen zeigte sich der Einfluss von Saccharose umso deutlicher in Abbildung 20B. So trat in Anwesenheit von 1 % Saccharose eine Reduktion der Hypokotyllänge sowie eine Erhöhung der Wurzellänge im Vergleich zur Anzucht ohne Saccharose auf. Dieser Effekt war gleichermaßen bei beiden Genotypen zu erkennen. Somit fielen die Unterschiede zwischen *agd12-9* und Columbia 8 gering aus. Folglich waren in Bezug auf das Längenwachstum der Keimlinge keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp Columbia 8 und der Mutante *agd12-9* zu erkennen.

4. 3. 3. Hypokotyl-Phototropismus der Mutante *agd12-9*

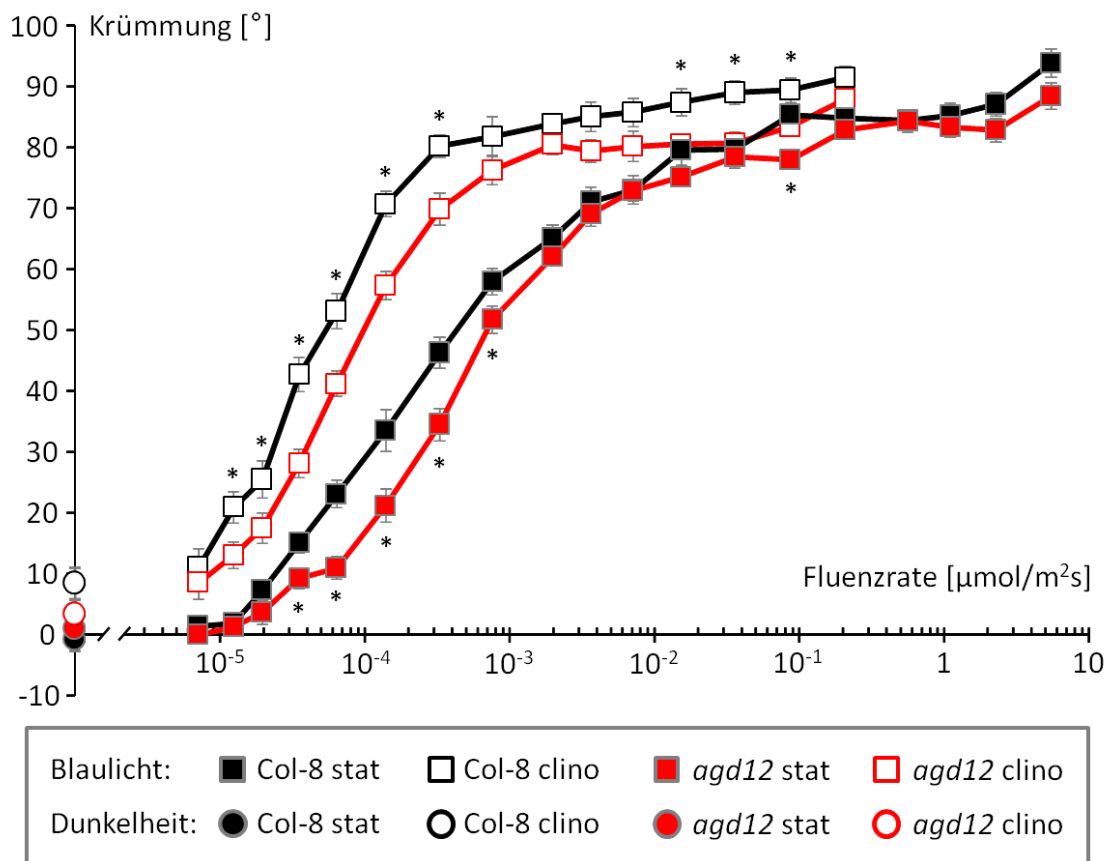


Abbildung 21: Dosis-Wirkungs-Kurven für Hypokotyl-Phototropismus von *agd12-9* und Columbia 8

Hypokotyl-Phototropismus 4 Tage alter Keimlingen von *agd12-9* und dessen Wildtyp Columbia 8 nach 24 Stunden seitlicher Belichtung mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$) sowie den dazugehörigen Dunkelkontrollen in statischer und clinostatisierter Strahlteilerbox. Mittelwerte von je 45 bis 132 Keimlingen mittels Imagetool bestimmt und mit Standardfehler versehen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen *agd12-9* und Columbia 8 mittels ANOVA ermittelt und mit Stern markiert. Publiziert in Michalski et al., 2017 (Figure 1A und 2A).

Die in Abbildung 21 dargestellten Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen für Columbia 8 und *agd12-9* eine phototrope Reaktion in Abhängigkeit zur Fluenzrate. Allgemein zeichneten sich alle gemessenen Tropismen durch einen Schwellenwert bei einer Fluenzrate von $\leq 10^{-5} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ aus, ab dem die Keimlinge phototrop reagierten. Auf den Schwellenwert folgte eine sigmoide Zunahme der Krümmung in Abhängigkeit von der Fluenzrate, welche in einem Plateau nahe 90° bei vergleichsweise hohen Fluenzraten abschloss. Dabei ergaben sich Unterschiede im Kurvenverlauf abhängig vom Genotyp der Keimlinge sowie zwischen statischem und clinostatisiertem Versuchsaufbau. Wobei alle Dunkelkontrollen gleichermaßen geringe Krümmungswerte nahe 0° aufwiesen.

Im Fall statischer Experimente lagen die Schwellenwerte beider Genotypen leicht oberhalb von $10^{-5} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Signifikante Unterschiede waren erst im darauf folgenden Bereich der linearen Steigung auszumachen. So nahm die Hypokotyl-Krümmung von *agd12-9* bei steigender Fluenzrate im Vergleich zu Columbia 8 deutlich weniger zu. Eine Annäherung beider Dosis-Wirkungs-Kurven erfolgte kurz bevor sich die Keimlinge mit 90° Krümmung maximal zur Lichtquelle ausrichteten. Im Fall clinostatisierter Experimente lagen die extrapolierten Schwellenwerte beider Genotypen leicht unterhalb von $10^{-5} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Auch hier zeigte *agd12-9* bei der darauf folgenden linearen Steigung

einen verringerten Anstieg der Hypokotyl-Krümmung bei zunehmender Fluenzrate. Diese signifikanten Unterschiede setzten sich bis zum Plateau-Bereich ab $10^{-3} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ fort.

Neben signifikanten Unterschieden zwischen den Dosis-Wirkungs-Kurven von *agd12-9* und Columbia 8 zeigten sich zudem Unterschiede zwischen statischem und clinostatisierten Versuchsaufbau. So zeichneten sich als Folge der Rotation des Versuchsaufbaus verringerte Schwellenwerte ab. Zudem fielen die Bereiche linearen Anstiegs durch eine etwas stärkere Steigung auf. Als Folge dessen wurde der Plateau-Bereich bei clinostatisierter Strahlteilerbox von beiden Genotypen schneller erreicht. Die Stärke der Krümmung war dabei jedoch vergleichbar mit der bei statischer Strahlteilerbox und liegt im Bereich von 80° bis 90° . Zusammenfassend wiesen Hypokotyle der Mutante *agd12-9*, sowohl mit als auch ohne Clinostatisierung, einen hypophototropen Phänotyp auf.

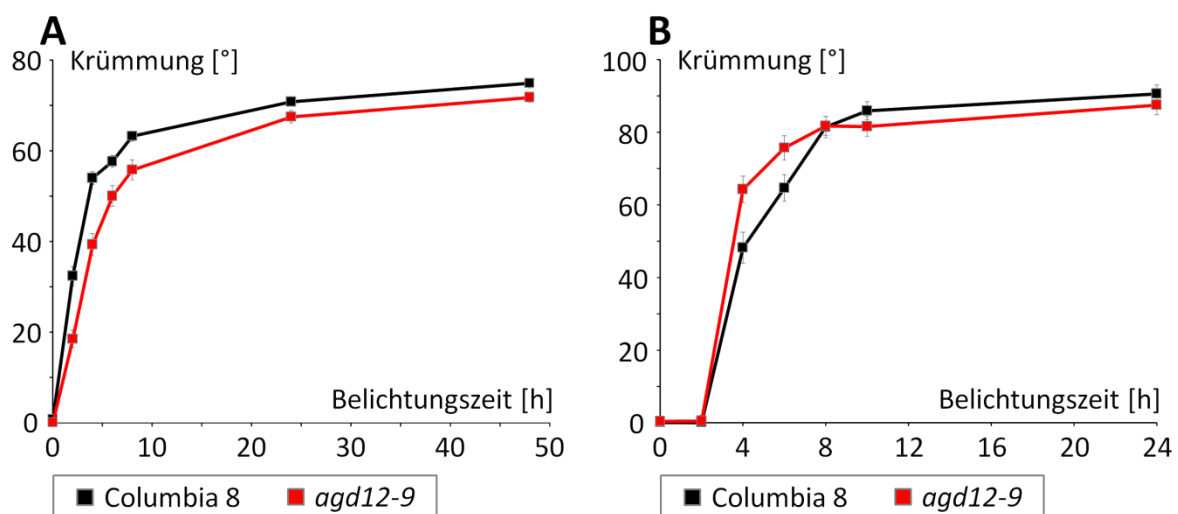


Abbildung 22: Kinetik des Hypokotyl-Phototropismus von *agd12-9* und Columbia 8

Bestimmung der Hypokotyl-Krümmung 3 bis 5 Tage alter Keimlinge von *agd12-9* und Columbia 8 in Folge von seitlicher Belichtung mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$) nach Belichtungszeiten von 0 bis 48 Stunden mit einer Fluenzrate von (A) $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ bzw. (B) $7,4 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Mittelwerte der je 52 Keimlinge wurden mittels Imagetool bestimmt und mit Standardfehler versehen.

Die in Abbildung 22 dargestellten Kurven zeigen den Hypokotyl-Phototropismus der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 in Abhängigkeit von der Belichtungszeit bei geringen (Abb. 22A) und hohen (Abb. 22B) Fluenzraten. In beiden Fällen zeigten die untersuchten Keimlinge keine nennenswerte Hypokotyl-Krümmung zu Beginn der Belichtung. Bei schwacher Belichtung (Abb. 22A) kam es schon nach 2 Stunden zu einer phototropen Reaktion bei *agd12-9* und Columbia 8. Diese nahm bis zu einem Zeitraum zwischen 6 bis 8 Stunden steil zu und erreichte nach noch längerer Belichtungszeit ein Plateau bei einer Krümmung von 70° . Im Vergleich zu Columbia 8 zeigte die Mutante *agd12-9* hierbei eine stets verringerte phototrope Reaktion. Dieser Unterschied trat vor allem bei kurzen Belichtungszeiten hervor.

Dem entgegen zeigte sich bei beiden Genotypen keine phototrope Reaktion nach 2 Stunden stärkerer Belichtung (Abb. 22B). Die erste starke Reaktion konnte erst nach 4 Stunden Belichtung

nachgewiesen werden. Die Zunahme der Krümmung schwächte sich bei höheren Belichtungszeiten ab, bis sie nach 8 Stunden ein Plateau im Bereich von 85° erreichte. Dies entsprach einer höheren Endkrümmung nach 24 Stunden Belichtung als bei niedrigeren Fluenzraten mit unter 70° nach 24 Stunden Belichtung. Zudem zeigte die Mutante *agd12-9* nach 4 und 6 Stunden Belichtung mit hoher Fluenzrate eine deutlich stärkere Hypokotyl-Krümmung als Columbia 8. Ein Resultat welches sich nach 8 Stunden wieder umkehrte. Demnach war über den zeitlichen Verlauf der Hypokotyl-Krümmung ein größtenteils hypophototroper Phänotyp von *agd12-9* auszumachen.

4. 3. 4. Wurzel-Phototropismus der Mutante *agd12-9*

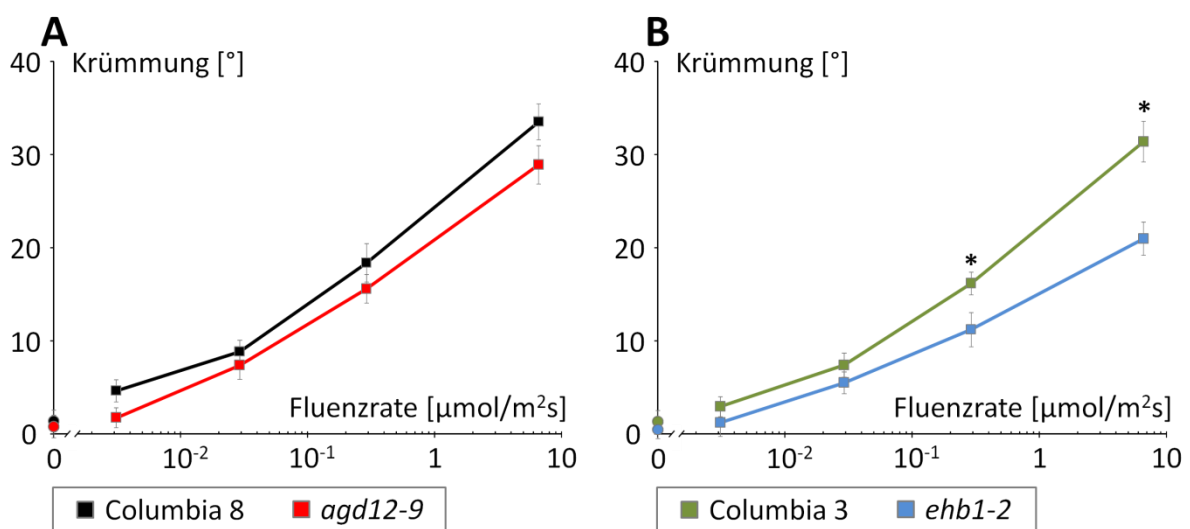


Abbildung 23: Wurzel-Phototropismus von *agd12-9* und *ehb1-2* in einer statischen Strahlteilerbox

Wurzel-Phototropismus 4 Tage alter Keimlinge von (A) *agd12-9* und dessen Wildtyp Columbia 8 sowie (B) *ehb1-2* und dessen Wildtyp Columbia 3 nach 48 Stunden seitlicher Blaulichtbestrahlung ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$) von 2 Tage alten etiolierten Keimlingen inklusive Dunkelkontrollen in einer statischen Strahlteilerbox. Mittelwerte von je 41 bis 60 Keimlingen wurden mittels Imagetool bestimmt und der Standardfehler ermittelt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Mutante und Wildtyp wurden mittels ANOVA berechnet und bei signifikanten Unterschieden mit Stern markiert. Publiziert in Michalski et al., 2017 (Figure 3).

Die in Abbildung 23 dargestellten Kurven zeigen den Wurzel-Phototropismus der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 (Abb. 23A) sowie der Mutante *ehb1-2* und des Wildtyps Columbia 3 (Abb. 23B) in Abhängigkeit von der Fluenzrate in einer statischen Strahlteilerbox. Dabei zeigt sich in beiden Abbildungen, dass alle dargestellten Dunkelkontrollen mit Krümmungswerten nahe 0° keine phototrope Reaktion aufwiesen. Als Folge der Belichtung mit Blaulicht kam es hingegen zu einer Krümmung, welche mit steigender Fluenzrate bei allen Genotypen zunahm, sodass maximale Krümmungswerte von über 30° erreicht werden konnten. Ein Plateau-Bereich bzw. Maximum der phototropen Reaktion war dabei nicht zu erkennen. Eine zusätzliche Gemeinsamkeit der vier untersuchten Genotypen war deren Schwellenwert bei unter $10^{-2} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Dieser lag somit deutlich höher als beim Hypokotyl-Phototropismus (vergl. Abb. 21).

Beim Vergleich zwischen *agd12-9* und Columbia 8 wurde deutlich, dass die Mutante *agd12-9* einen durchgehend leicht reduzierten Phototropismus aufwies (Abb. 23A). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei *ehb1-2* und Columbia 3 (Abb. 23B), bei denen die Mutante ebenfalls einen reduzierten Phototropismus erkennen ließ. Dabei nahmen die Unterschiede zwischen *ehb1-2* und Columbia 3 mit zunehmender Fluenzrate jedoch derart zu, dass bei höheren Fluenzraten ab $0,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ die Mutante *ehb1-2* einen signifikant reduzierten Wurzelphototropismus aufwies. Folglich zeigten sowohl die Wurzeln von *agd12-9* als auch *ehb1-2* ein hypophototropes Verhalten.

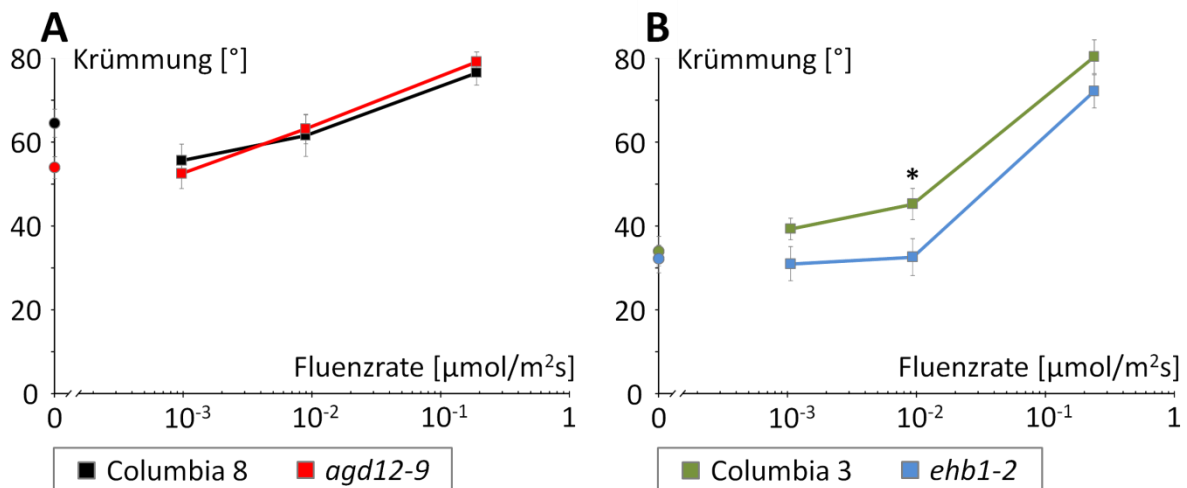


Abbildung 24: Wurzel-Phototropismus von *agd12-9* und *ehb1-2* in einer clinostatisierten Strahlteilerbox

Der Wurzel-Phototropismus von 4 Tage alten Keimlingen nach 48 Stunden seitlicher Blaulichtbestrahlung von (A) *agd12-9* und dessen Wildtyp Columbia 8 sowie (B) *ehb1-2* und dessen Wildtyp Columbia 3 ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$) inklusive Dunkelkontrollen in einer clinostatisierten Strahlteilerbox. Mittelwerte von je 21 bis 26 Keimlingen wurden mittels Imagetool bestimmt und der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Mutante und Wildtyp mittels ANOVA ermittelt und signifikante Unterschiede mit einem Stern markiert. Publiziert in Michalski et al., 2017 (Figure 4).

Die in Abbildung 24 dargestellten Kurven zeigen den Wurzel-Phototropismus der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 (Abb. 24A) sowie der Mutante *ehb1-2* und des Wildtyps Columbia 3 (Abb. 24B) in Abhängigkeit zur Fluenzrate in einer clinostatisierten Strahlteilerbox. Dabei wurde deutlich, dass bereits alle Dunkelkontrollen eine deutliche Krümmung aufwiesen. So zeigten *ehb1-2* und Columbia 3 Wurzelkrümmungen von über 30° , die Mutante *agd12-9* und Columbia 8 sogar Werte von über 50° bzw. 60° Krümmung. Im Fall der Dunkelkontrolle von Columbia 8 überstieg dieser Wert zudem die Messwerte nach Belichtung mit unter $10^{-2} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blaulicht. Im Fall der anderen drei Genotypen entsprachen die Dunkelkontrollen dagegen den Resultaten bei niedrigster Belichtung mit $10^{-3} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. So nahm die Wurzelkrümmung bei allen Genotypen mit steigender Fluenzrate zu. Dabei zeigte die Mutante *agd12-9* (Abb. 24A) im Vergleich zum Wildtyp Columbia 8 einen nahezu identischen Wurzelphototropismus. Die Mutante *ehb1-2* hingegen krümmte sich bei allen Fluenzraten deutlich geringer als der dazugehörige Wildtyp Columbia 3. Zusammenfassend zeigte *agd12-9* keinen veränderten Wurzelphototropismus bei Clinostatisierung, wohingegen die Wurzeln von *ehb1-2* hypophototrop reagierten.

4. 3. 5. Gravitropismus der Mutante *agd12-9* in Abhängigkeit von Saccharose

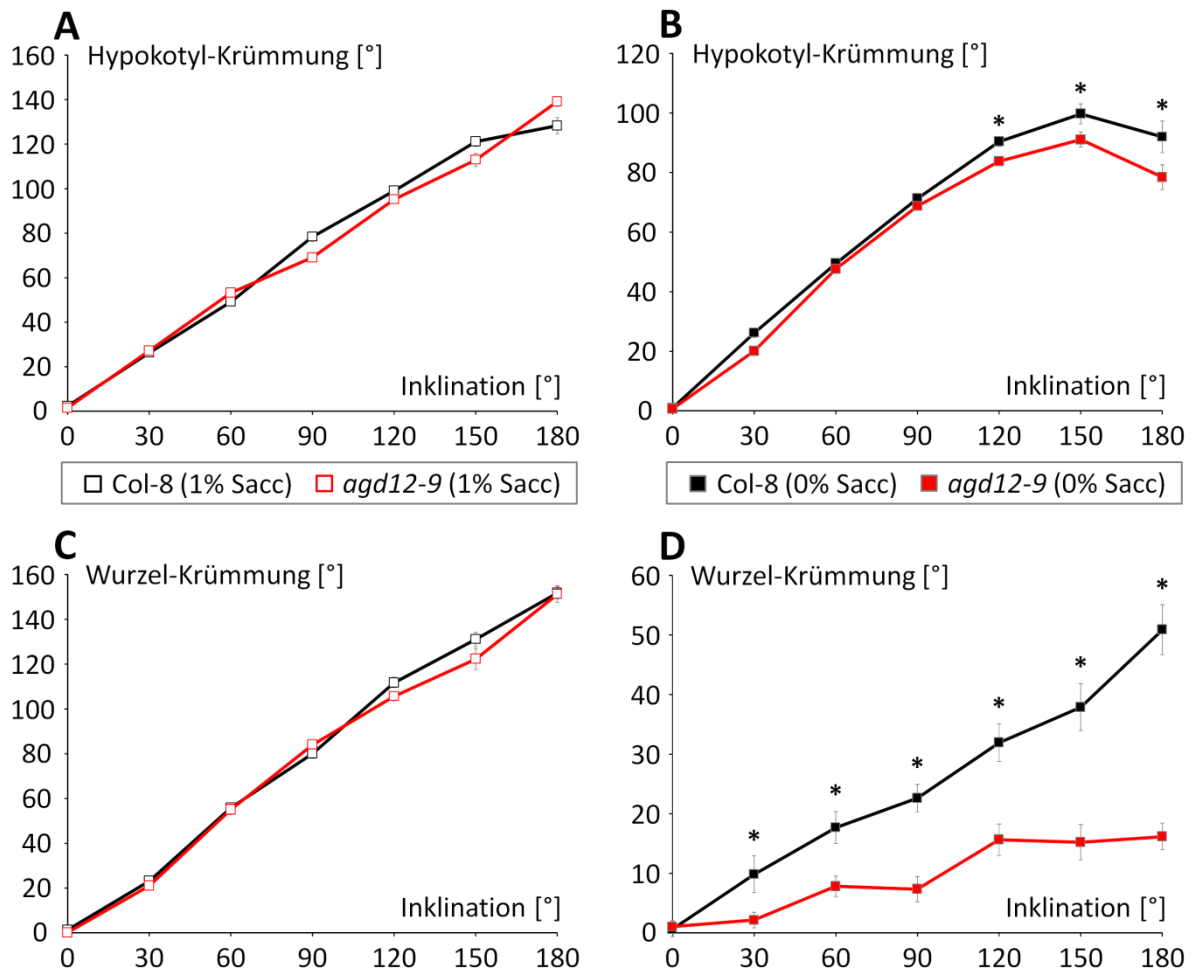


Abbildung 25: Gravitropismus von *agd12-9* und Columbia 8 in Abhängigkeit von Saccharose

Gravitropismus 4 Tage alter Keimlinge von *agd12-9* und dessen Wildtyp Columbia 8 nach 24 Stunden Inklination 3 Tage alter etiolierter Keimlinge um 0° bis 180°, gewachsen auf ½ MS-Phytigel mit (A und C) 1% Saccharose bzw. (B und D) ohne Saccharose. Mittelwerte der (A und B) Hypokotyle und (C und D) Wurzeln von 57 bis 74 Keimlingen mittels ImageTool bestimmt und dazugehörige Standardfehler ermittelt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Mutante und Wildtyp wurden mittels ANOVA ermittelt und mit Stern markiert. Publiziert in Dümmer et al., 2016a (Figure 5a) und Dümmer et al., 2016 (Figure 2a).

Die in Abbildung 25 dargestellten Kurven zeigen die Hypokotyl- und Wurzelkrümmung der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 in Abhängigkeit von verschiedenen Inklinationswinkeln in An- bzw. Abwesenheit von Saccharose. Mit steigender Inklination nahm in allen Fällen die Krümmung von Hypokotyl und Wurzel zu. Bei Versuchen mit Saccharose zeigte sich bei Hypokotylen und Wurzeln ein nahezu proportionales Verhältnis zwischen Inklinations- und Krümmungswinkel (Abb. 25A und C). Dabei ließen die gemessenen Krümmungswinkel der Mutante *agd12-9* sowohl bei Hypokotyl als auch Wurzel keine nennenswerten Unterschiede zum Wildtyp Columbia 8 erkennen.

Bei Abwesenheit von Saccharose zeigten Hypokotyle ein ebenfalls fast proportionales Verhältnis zwischen Inklination und Krümmung bis zu 90° Inklination (Abb. 25B). Danach schwächte sich bei zunehmender Inklination der Zuwachs der Krümmung jedoch ab, erreichte bei einer Inklination von

150° sein Maximum und fiel abschließend bei einer Inklination von 180° wieder. Dabei zeigten Hypokotyle von *agd12-9* im Vergleich zu Columbia 8 ab 120° Inklination eine zunehmend geringere Krümmung. Im Fall der Wurzelkrümmung in Abwesenheit von Saccharose wiesen beide Genotypen im Vergleich zu Wurzeln mit 1 % Saccharose eine weitaus geringere gravitrope Reaktion auf (Abb. 25D). Dabei zeigten Wurzeln von *agd12-9* bei jeder Inklination eine im Vergleich zu Columbia 8 signifikant geringere Krümmung. Ein Unterschied, der mit steigender Inklination zunahm. Demnach zeigten Hypokotyle und Wurzeln von *agd12-9* ein hypogravitropes Verhalten. Ein Phänotyp, der in Anwesenheit von Saccharose jedoch nicht auftrat.

4. 3. 6. Clinostat-Zentrifugation der Mutante *agd12-9*

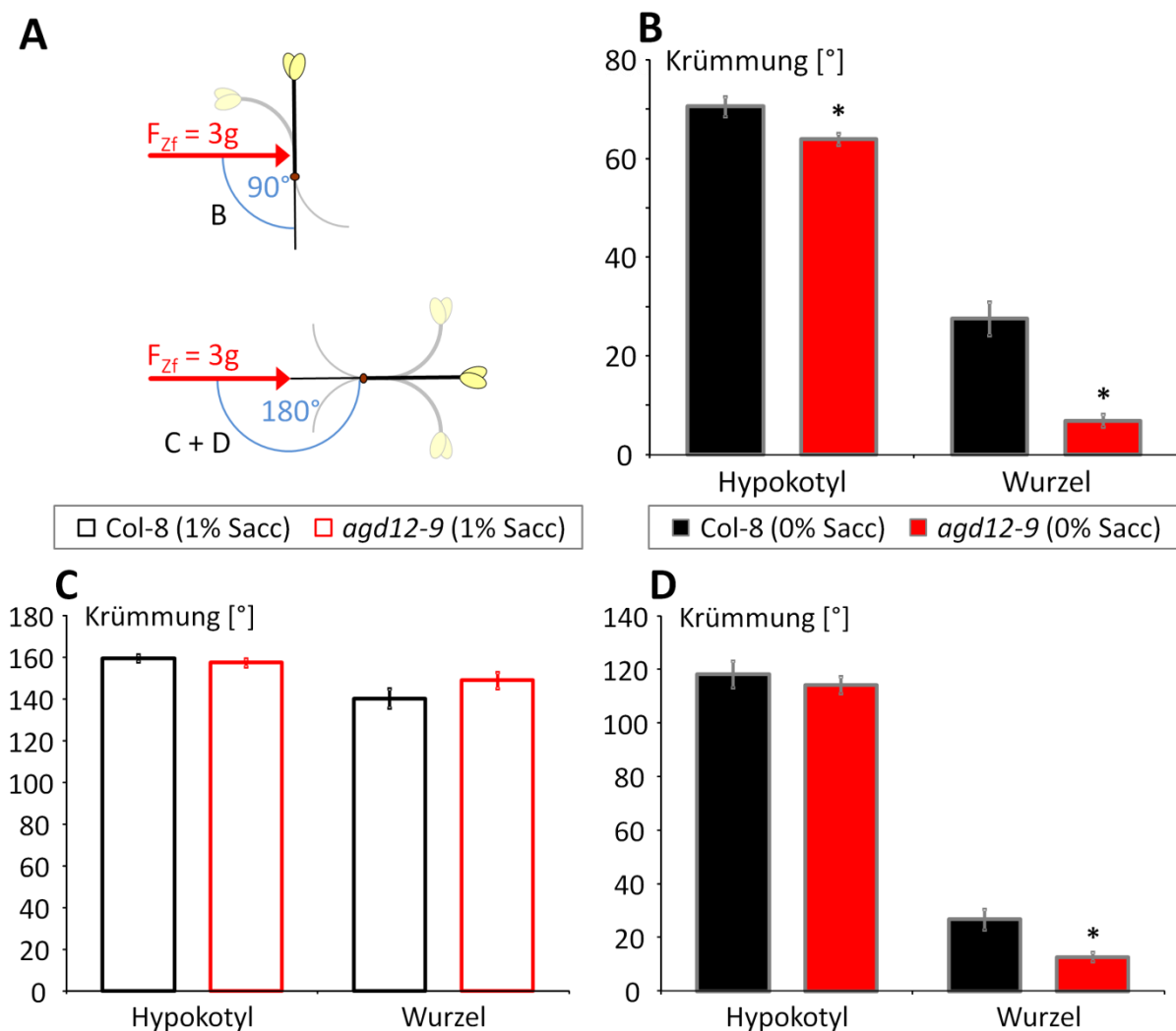


Abbildung 26: Clinostat-Zentrifugation von *agd12-9* und Columbia 8

(A) Schematische Darstellung der Versuche zum Gravotropismus von Hypokotyl und Wurzel mit 4 Tage alten Keimlingen von *agd12-9* und dessen Wildtyp Columbia 8 nach 24 Stunden Rotation in einer Clinostat-Zentrifuge mit Zentrifugalkraft F_{zf} , bei der Schwerkraftreize von 3 g mit einem Winkel von (B) 90° lateral auf Keimlinge bzw. einem Winkel von (C und D) 180° auf die Wurzelspitze einwirken. Keimlinge wuchsen auf ½ MS-Phytigel mit (D) 1% Saccharose bzw. (B und C) ohne Saccharose. Die Berechnung der abgebildeten Mittelwerte der Krümmung von 62 bis 153 Keimlingen erfolgte durch Imagetool und wurde mit dazugehörigen Standardfehlern versehen. Signifikante Abweichungen ($p < 0,05$) der *agd12-9* Mutante vom Wildtyp Columbia 8 wurden mittels ANOVA bestimmt und mit Stern markiert.

Abbildung 26 zeigt Hypokotyl- und Wurzelkrümmung der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 nach Clinostat-Zentrifugation, bei der Zentrifugalkräfte im Winkel von 90° bzw. 180° einwirkten. So zeigte sich nach Einwirkung der Zentrifugalkraft im Winkel von 90° bei *agd12-9* eine signifikant geringere Krümmung als bei Columbia 8 sowohl beim Wurzel- als auch beim Hypokotyl-Gravitropismus (Abb. 26B). Dies stellte sich besonders bei Wurzeln von *agd12-9* mit einer vierfach geringeren Krümmung dar. Im Fall einer im Winkel von 180° einwirkenden Zentrifugalkraft nahmen die Werte beider Genotypen stark zu (Abb. 26D). So stieg die Krümmung der Hypokotyle beider Genotypen weit über 100°. Wurzeln wiesen dagegen keinen derartigen Anstieg auf, zeigten jedoch eine deutlich geringere Krümmung bei der Mutante *agd12-9*. Bei Anzucht in Anwesenheit von 1% Saccharose erhöhten sich hingegen alle Krümmungswerte (Abb. 26C). So erreichten Hypokotyle von *agd12-9* und Columbia 8 Krümmungswerte um 160° sowie Wurzeln Werte im Bereich von 140° bis 150°. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Genotypen konnten demnach in Anwesenheit von Saccharose nicht mehr festgestellt werden. Somit wiesen Hypokotyle und Wurzeln der Mutante *agd12-9* auch bei Clinostat-Zentrifugation einen hypogravitropen Phänotyp in Abwesenheit von Saccharose auf.

4. 3. 7. Statolithenfärbung in Wurzelspitze der Mutante *agd12-9*

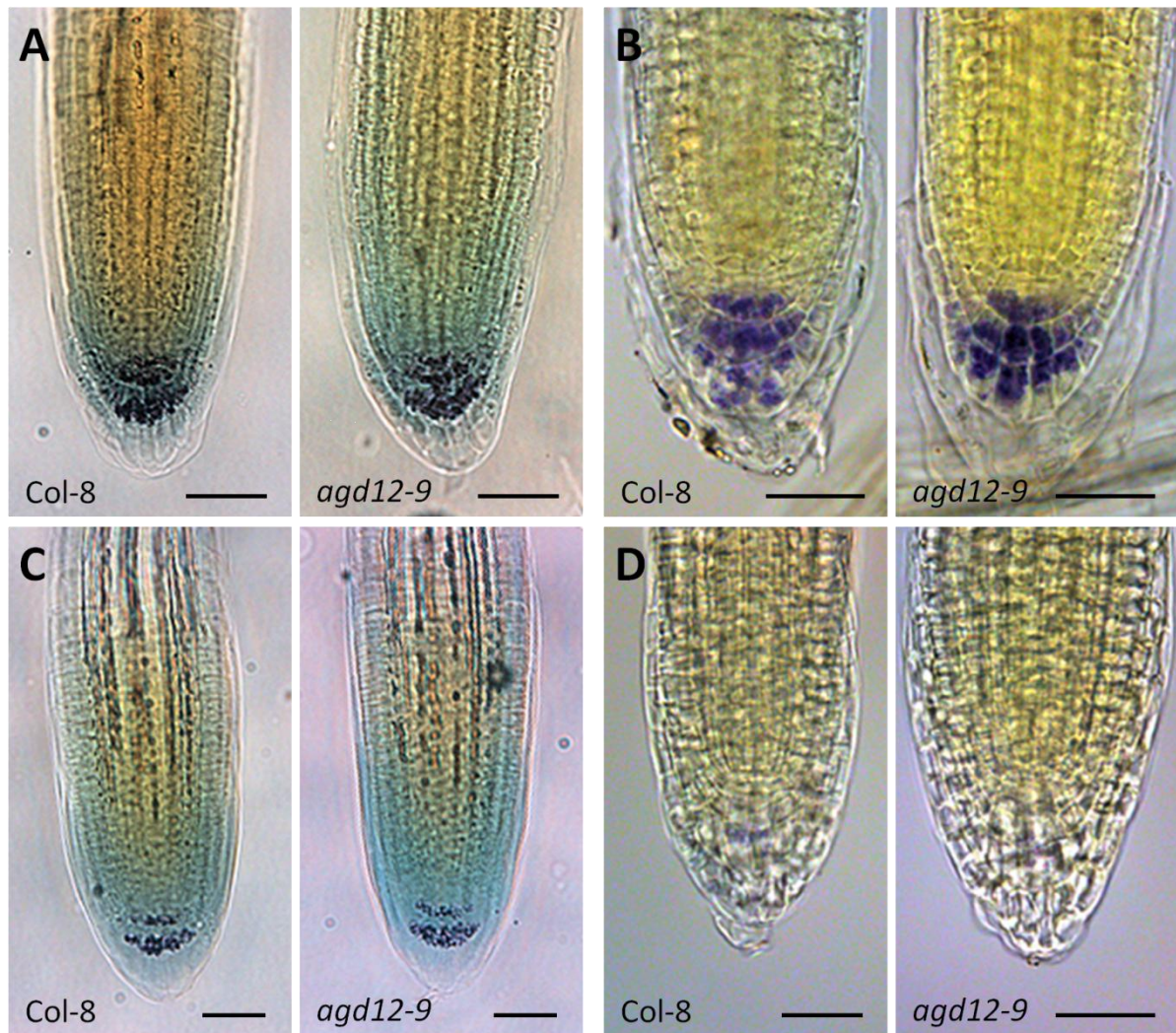


Abbildung 27: Statolithen in Wurzelspitzen von *agd12-9* und Columbia 8 in Abhängigkeit von Saccharose

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Wurzelspitzen von Columbia 8 und *agd12-9* nach (A und C) 3 Tagen bzw. (B und D) 7 Tagen Wachstum auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit (A und B) 1% Saccharose bzw. (C und D) ohne Saccharose nach Behandlung mit Iod-Kaliumiodid- und Klärlösung. Größenstandard entspricht 50 µm.

Abbildung 27 zeigt Wurzelspitzen von *agd12-9* und Columbia 8 nach Stärkefärbung mittels Iod-Kaliumiodid. Die stärkehaltigen Statolithen innerhalb der Statocyten der Columella waren demnach dunkelviolett angefärbt. Bei allen abgebildeten Wurzelspitzen war die äußere Zellschicht der Wurzelspitze frei von Statolithen. Erst die darüber liegenden Zellen der Columella wiesen mehr oder weniger stark ausgeprägte Statolithen auf. Die Bezeichnung der einzelnen Zellschichten erfolgte nach Blancaflor et al., 1998. So waren im Fall von Keimlingen mit 1 % Saccharose Statolithen in den drei S1-, S2- und S3-Zellschichten der Columella zu erkennen (Abb. 27A und B). Diesbezüglich zeigten sich zudem keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen sowie der Anzuchtzeit. Dagegen waren nach 3 Tagen Anzucht auf Medium ohne Saccharose bei beiden Genotypen Statolithen nur in den zwei Zellschichten S2 und S3 zu erkennen (Abb. 27C). Zudem wiesen die abgebildeten Statolithen im Vergleich zur Anzucht mit 1% Saccharose, eine geringere Größe oder Anzahl auf. Nach 7 Tagen Anzuchtzeit waren diese Unterschiede noch gravierender. So ließen sich bei Wurzelspitzen beider

Genotypen nur noch geringe Mengen an Stärke nachweisen (Abb. 27D). Folglich zeigte sich, dass Saccharose und Anzuchtzeit die Wurzeln beider Genotypen beeinflussten. Unterschiede zwischen Columbia 8 und *agd12-9* hinsichtlich der Wurzelanatomie lagen jedoch nicht vor.

4. 3. 8. Kinetik des Gravitropismus der Mutante *agd12-9*

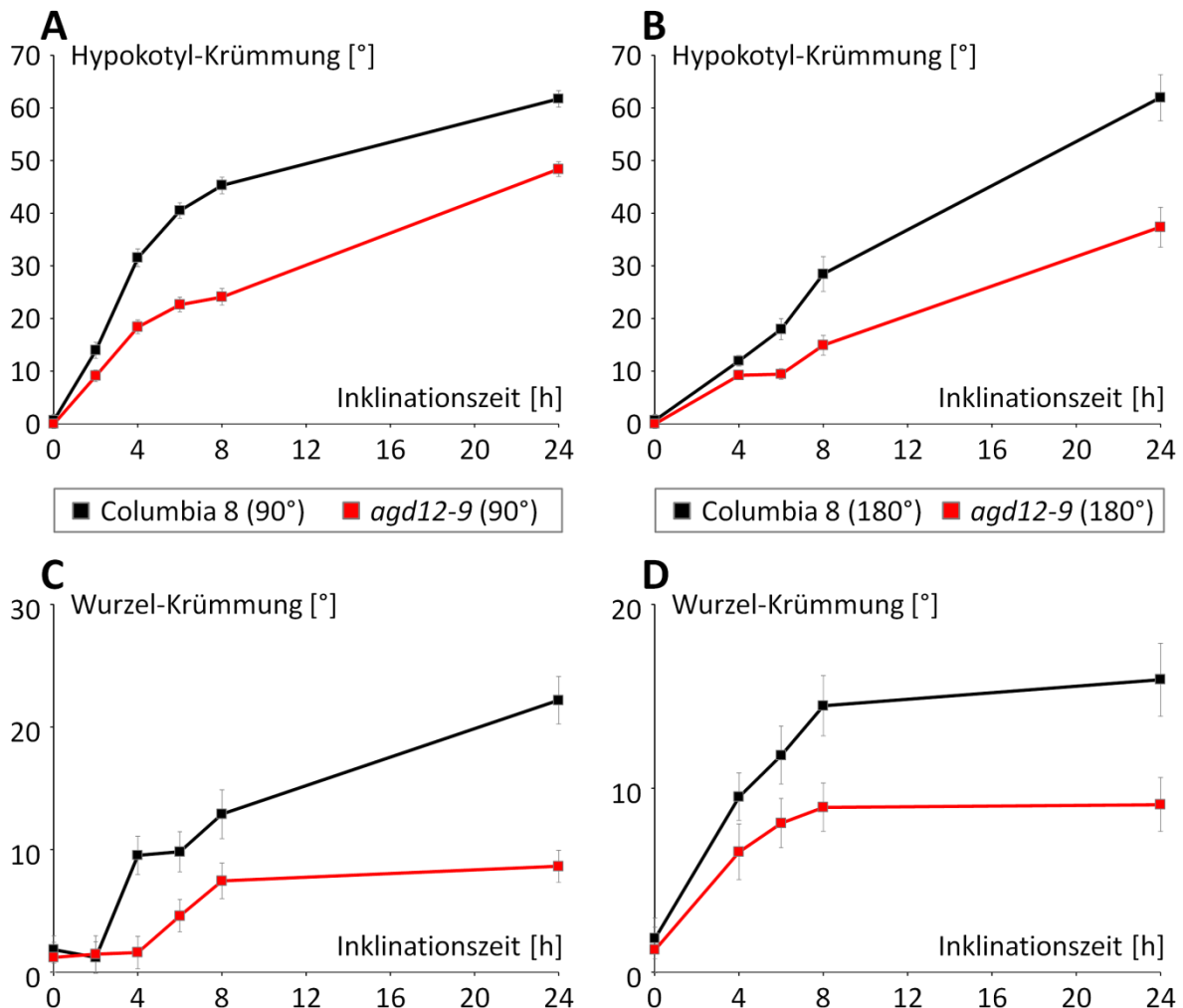


Abbildung 28: Kinetik des Gravitropismus von *agd12-9* nach 90° und 180° Inklination

Krümmung von (A und B) Hypokotyl und (C und D) Wurzel 4 Tage alter Keimlinge von *agd12-9* und Columbia 8 nach Inklination um (A und C) 90° bzw. (B und D) 180° nach 0 bis 24 Stunden. Die Mittelwerte von 63 bis 143 Keimlingen wurden mit Imagetool bestimmt und mit dazugehörigen Standardfehlern versehen.

Abbildung 28 zeigt die gravitrope Krümmung von *agd12-9* und Columbia 8 nach Inklination von 90° bzw. 180° in Abhängigkeit von der Inklinationszeit. Dabei wurde bei allen abgebildeten Resultaten deutlich, dass sich die Mutante *agd12-9* stets geringer krümmte als der Wildtyp Columbia 8. So zeigten Hypokotyle beider Genotypen bei 90° Inklination bereits nach 2 Stunden eine unterschiedlich starke gravitrope Reaktion (Abb. 28A). Diese Unterschiede wurden mit zunehmender Inklinationszeit stärker und erreichten nach 24 Stunden ihr vorläufiges Maximum. Bei einer Inklination um 180° zeichnete sich für Hypokotyle ein ähnliches Bild ab (Abb. 28B). Bei Wurzeln traten nach 90° Inklination

on ebenfalls die größten Unterschiede zwischen beiden Genotypen nach 24 Stunden auf (Abb. 28C). Anders als beim Hypokotyl kam es im Fall von Columbia 8 jedoch erst nach 4 Stunden bzw. bei *agd12-9* nach 6 Stunden zu ersten gravitropen Reaktionen. Dagegen krümmten sich Wurzeln von Columbia 8 und *agd12-9* bei einer Inklination um 180° bereits nach 4 Stunden (Abb. 28D). Somit war der hypogravitrope Phänotyp von *agd12-9* sowohl bei frühen als auch bei späten Stadien der Hypokotyl- und Wurzelkrümmung auszumachen.

4. 3. 9. Gravitropismus der Mutante *agd12-9* in Abhängigkeit von NPA

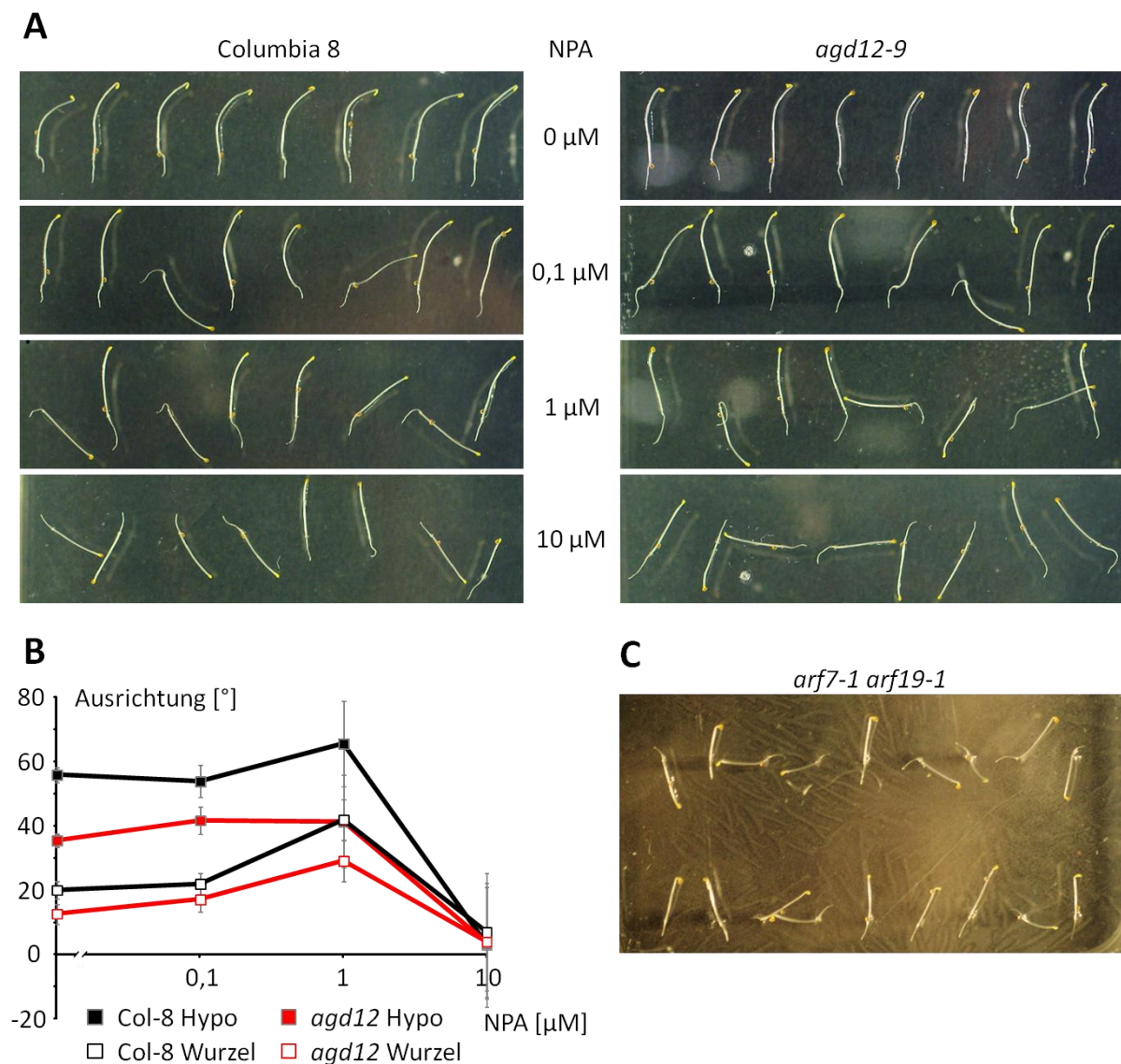


Abbildung 29: Gravitropismus der Mutante *agd12-9* in Abhängigkeit von NPA

(A) Gravitrope Reaktion von 3,5 Tage alten Keimlinge der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 nach 24 Stunden 90° Inklination bei verschieden hoher NPA-Konzentration in ½ MS-Phytigel. (B) Darstellung der resultierenden Mittelwerte bei Hypokotyl und Wurzel von jeweils 31 bis 36 Keimlingen mittels ImageTool mit Standardfehler. (C) Wachstum 3 Tage alter Keimlinge der Doppelmutante *arf7 arf19* ohne Inklination.

Abbildung 29 zeigt die gravitrope Reaktion von Keimlingen der Mutante *agd12-9* und des Wildtyps Columbia 8 nach Inklination von 90° bei unterschiedlichen Konzentrationen des Auxintransport-Inhibitors NPA (Abb. 29A und B) sowie das Wachstumsverhalten der Doppelmutante *arf7-1 arf19-1* (Abb. 29C). Dabei zeigte sich in Abwesenheit von NPA eine normale gravitrope Reaktion von *agd12-9* und Columbia 8 (Abb. 29B). Wobei die Krümmung von Hypokotyl und Wurzel bei *agd12-9* wie zuvor beobachtet geringer ausfiel. Ein Trend, der sich in Anwesenheit von 0,1 µM und 1 µM NPA fortsetzte. So hatten 0,1 µM NPA keine Auswirkung auf die gravitrope Reaktion beider Genotypen. 1 µM NPA hingegen schien die Werte geringfügig zu erhöhen. Im Fall von 10 µM NPA kam es letztlich jedoch bei beide Genotypen zu einer vollständigen Inhibierung des Gravitropismus auf einen Wert nahe 0° (Abb. 29B).

Einen detaillierteren Blick ermöglichten Aufnahmen der Keimlinge (Abb. 29A). So zeigten vereinzelte Keimlinge beider Genotypen bereits bei 0,1 µM NPA ein agravitropes Verhalten. Bei noch höheren NPA-Konzentrationen von 1 µM NPA und letztlich 10 µM NPA nahm der Anteil agravitroper Keimlinge weiter zu. Dies resultierte in einer scheinbar randomisierten Ausrichtung von Keimlingen beider Genotypen in Anwesenheit von 10 µM NPA (Abb. 29A). Zudem wiesen Hypokotyl und Wurzel betroffener Keimlinge zum Teil unterschiedliche Ausrichtungen auf. Ein Wachstumsverhalten, dass bei der Doppelmutante *arf7-1 arf19-1* ebenso zu erkennen war (Abb. 29C). Zusammenfassend zeigte sich, dass Hypokotyl- und Wurzelgravitropismus von *agd12-9* und Columbia 8 gleichermaßen durch NPA gestört werden.

4. 3. 10. Addition von gravitropen und phototropen Reizen auf *agd12-9*

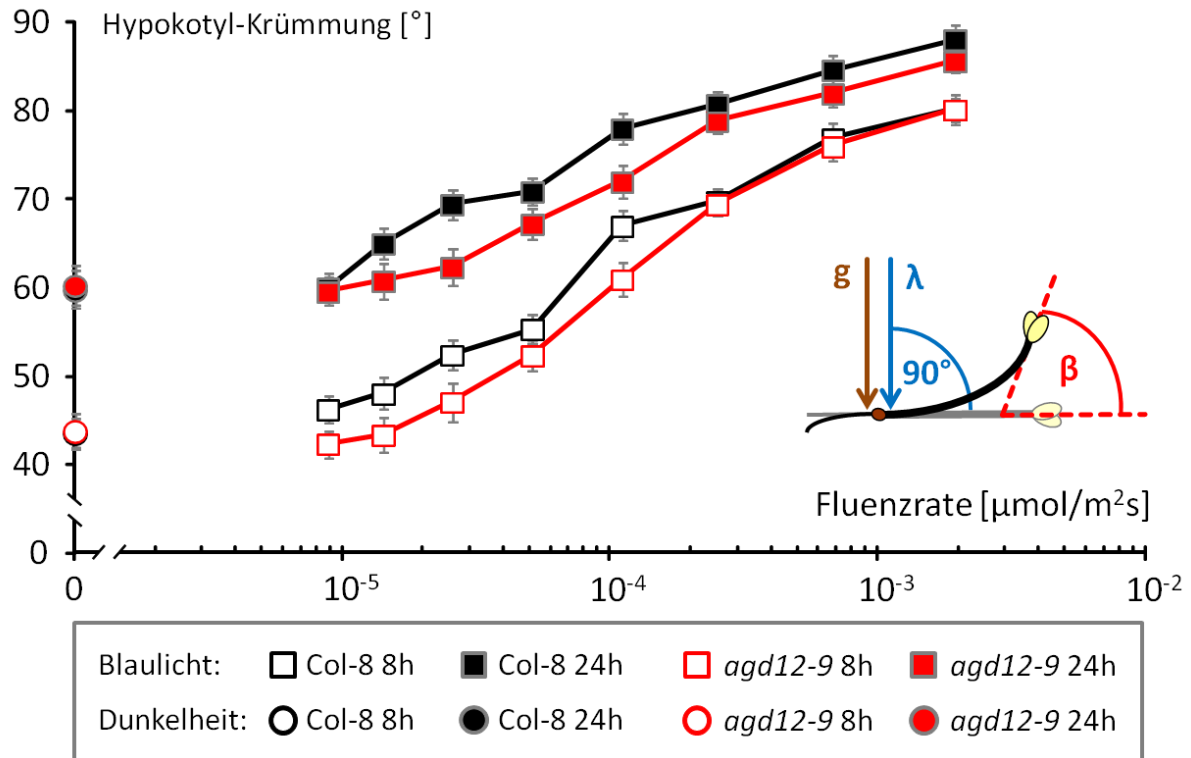


Abbildung 30: Addition von Gravi- und Phototropismus von *agd12-9* und Columbia 8

Hypokotyl-Krümmung 4 Tage alter Keimlinge von *agd12-9* und dessen Wildtyp Columbia-8 nach 24 Stunden lateraler Blaublichtbestrahlung ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$) sowie gleichgerichtetem Schwerkraftreiz (g) durch Inklinierung der Keimlinge samt Lichtquelle um 90° . Die Hypokotyl-Krümmung (β) der auf $\frac{1}{2}$ MS-Phytigel ohne Saccharose gewachsenen Keimlinge wurde nach 8 und 24 Stunden mittels ImageTool bestimmt. Abgebildet sind die resultierenden Mittelwerte von 48 bis 54 Keimlingen mit Standardfehlern.

Abbildung 30 zeigt die Hypokotyl-Krümmung von *agd12-9* und Columbia 8 als Folge von Blaublichtbestrahlung in Kombination mit einer Inklinierung von 90° nach 8 und 24 Stunden. Dabei waren in Folge einer 24 stündigen Belichtung und Inklinierung höhere Krümmungswerte als nach 8 Stunden zu erkennen. Gleiches traf auf alle Dunkelkontrollen zu, welche keine Unterschiede zwischen *agd12-9* und Columbia 8 aufzeigten. Bei zusätzlicher Belichtung zeigten sich jedoch geringe Unterschiede zwischen beiden Genotypen, welche im Bereich höherer Fluenzraten wieder abnehmen. Somit zeigte sich auch hier eine hypophototrope Hypokotyl-Krümmung bei *agd12-9*, welche durch den zusätzlichen Schwerkraftreiz scheinbar nicht beeinflusst wurde.

4. 4. 2. Längenwachstum in Abhängigkeit von CaCl_2 und CaO

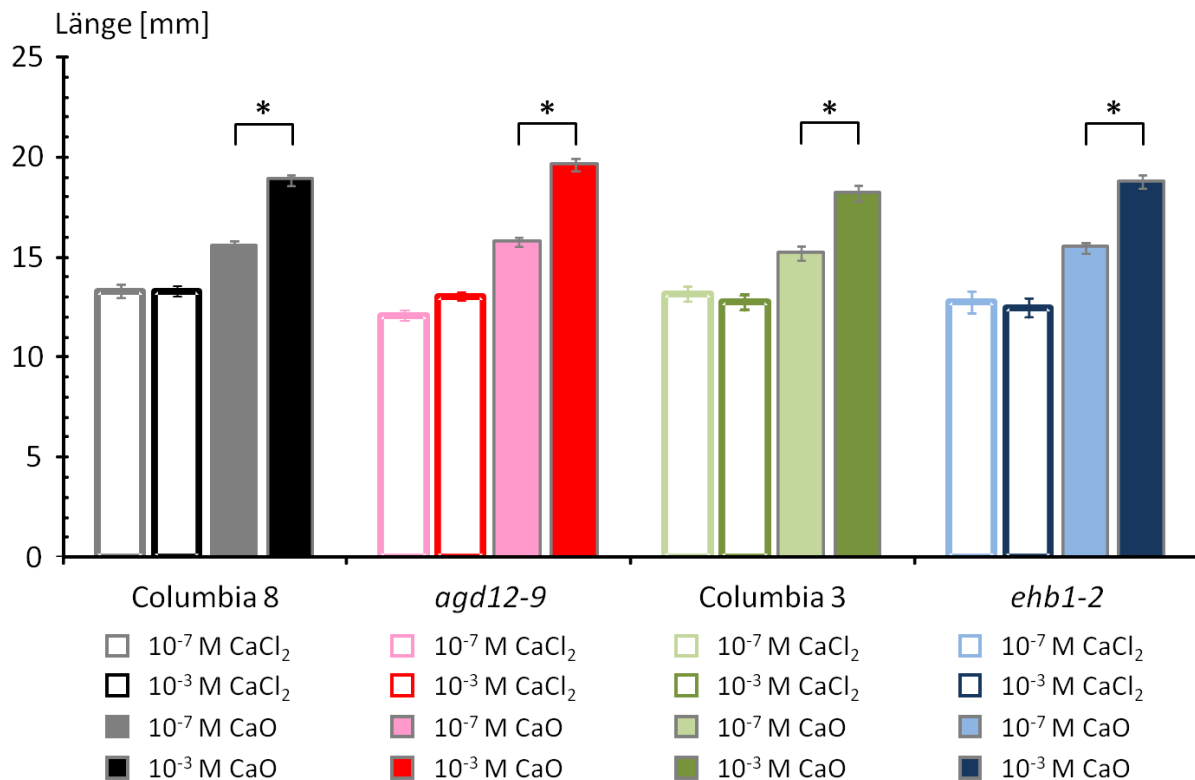


Abbildung 32: Längenwachstum von *agd12-9* und *ehb1-2* in Abhängigkeit von CaCl_2 und CaO

Gesamtlänge von 4 Tage alten etiolierten Keimlingen der Mutanten *agd12-9* und *ehb1-2* sowie deren Wildtypen Columbia 8 und Columbia 3. Die Keimlinge wuchsen auf Ca^{2+} -Minimalmedium mit 10^{-7} M bzw. 10^{-3} M CaCl_2 oder alternativem ½ MS-Phytigel mit 10^{-7} M bzw. 10^{-3} M CaO . Von je 27 bis 45 Keimlingen wurde mittels ImageJ die Länge bestimmt. Abgebildet sind die resultierenden Mittelwerte mit Standardfehlern. Signifikante Abweichungen ($p < 0,05$) zwischen Genotypen und Ca^{2+} -Konzentrationen wurden mittels ANOVA bestimmt und mit Stern markiert.

Abbildung 32 zeigt den Einfluss verschiedener Medien mit Ca^{2+} auf das Längenwachstum der Mutanten *agd12-9* und *ehb1-2* sowie der Wildtypen Columbia 8 und Columbia 3. Dabei zeigte sich, dass Keimlinge auf Ca^{2+} -Minimalmedium langsamer wuchsen, als auf alternativem ½ MS-Phytigel. Die CaCl_2 -Konzentration hatte keinen Einfluss auf das Wachstum auf Ca^{2+} -Minimalmedium. Einzig *agd12-9* zeigte bei 10^{-7} M CaCl_2 , im Vergleich zu höheren Konzentrationen sowie zum Wildtyp Columbia 8, ein leicht reduziertes Wachstum. Im Fall der längeren Keimlinge auf ½ MS-Phytigel zeigte sich dagegen, dass alle Genotypen bei höheren CaO -Konzentrationen stärker wuchsen.

4. 4. 3. Hypokotyl-Gravitropismus in Abhängigkeit von Calcium

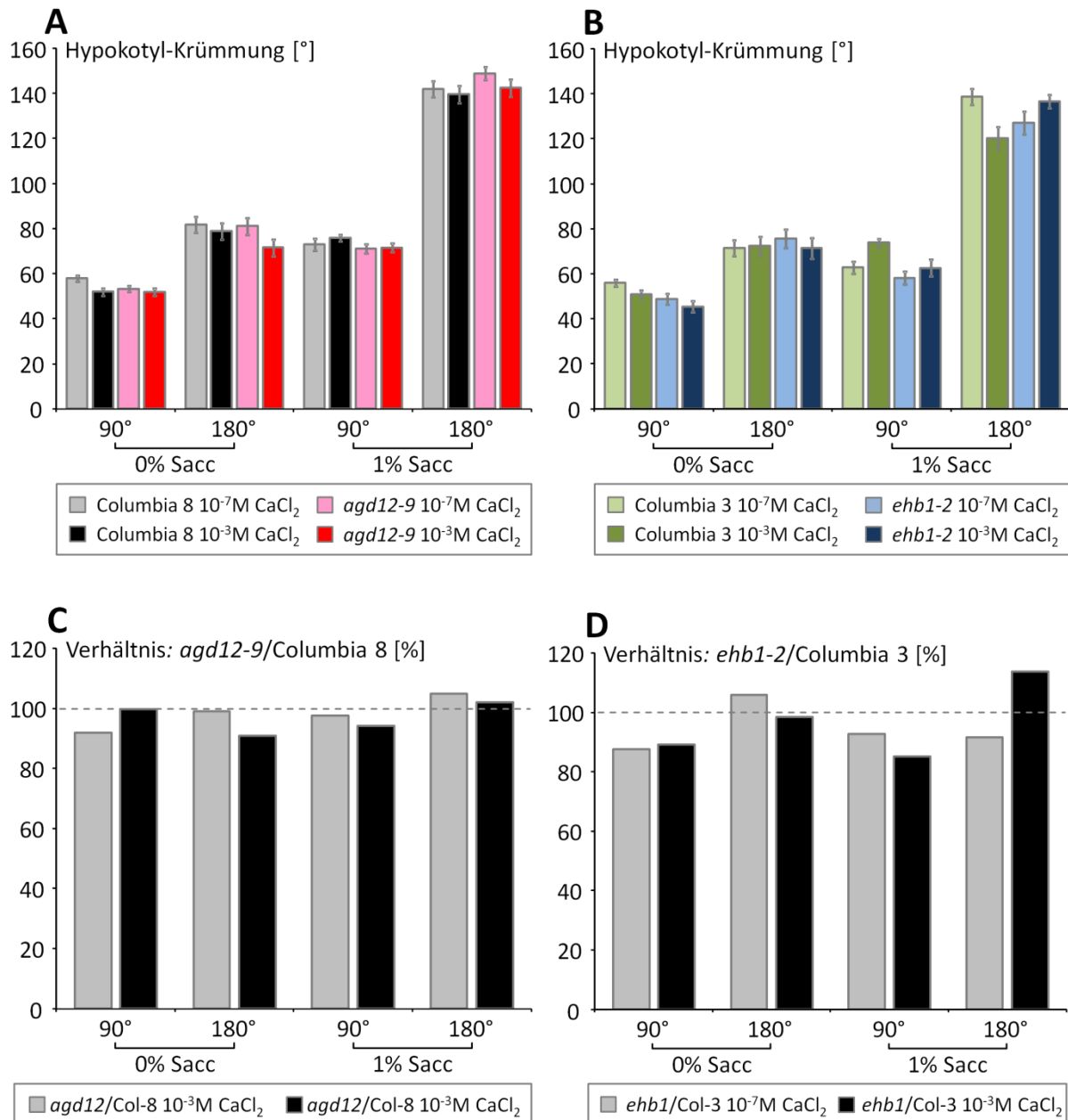


Abbildung 33: Hypokotyl-Gravitropismus von *agd12-9* und *ehb1-2* in Abhängigkeit von Saccharose und CaCl_2
 Krümmung des Hypokotyls 4 Tage alter Keimlinge von (A) *agd12-9* und seinem isogenen Wildtyp Columbia 8 sowie (B) *ehb1-2* und seinem isogenen Wildtyp Columbia 3 nach 24 Stunden Inklination von 90° bzw. 180°. Gewachsen auf Ca^{2+} -Minimalmedium mit 10^{-7} M bzw. 10^{-3} M CaCl_2 sowie 0% bzw. 1% Saccharose. Hypokotyl-Krümmung von 42 bis 73 Keimlingen wurde mittels Imagetool bestimmt und daraus resultierende Mittelwerte mit Standardfehlern versehen. (C und D) Verhältnis zwischen Mutante und Wildtyp, wobei 100% der Krümmung des Wildtyps entspricht. Publiziert in Dümmer et al., 2016 (Figure 4).

Abbildung 33 zeigt den Hypokotyl-Gravitropismus von *agd12-9* und Columbia 8 sowie *ehb1-2* und Columbia 3 nach eintägiger Inklinatation von 90° und 180° in Abhängigkeit von CaCl₂ und Saccharose. Dabei waren im Vergleich von *agd12-9* und Columbia 8 keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abb. 33A). Jedoch führten die Anhebung des Inklinationswinkels und die Anwesenheit von Saccharose zu einer Erhöhung der gravitropen Krümmung beider Genotypen. Unterschiedliche CaCl₂-Konzentrationen hatten dagegen kaum Einfluss auf die Hypokotyl-Krümmung und wirkten sich auch nicht auf das Verhältnis zwischen Krümmung von *agd12-9* und Columbia 8 aus (Abb. 33C).

Ähnlich verhielt es sich bei der Mutante *ehb1-2* und Columbia 3 (Abb. 33B). So ließen sich auch hier keine durchgängig signifikanten Unterschiede zwischen Genotypen oder CaCl₂-Konzentrationen erkennen (Abb. 33D). Bei erhöhter CaCl₂-Konzentration und 90° Inklinatation wiesen beide Genotypen jedoch in Abwesenheit von Saccharose eine leicht verringerte bzw. in Anwesenheit von Saccharose eine verstärkte Hypokotyl-Krümmung auf (Abb. 33B). Der größte Einfluss von CaCl₂ auf das Verhältnis von *ehb1-2* zu Columbia 3 zeigte sich jedoch bei 180° Inklinatation und 1 % Saccharose (Abb. 33D). So kehrte sich hier das Verhältnis beider Genotypen bei höheren CaCl₂-Konzentrationen um. Zusammenfassend waren sowohl die Erhöhung des Inklinationswinkels als auch die Anwesenheit von Saccharose förderlich für den Hypokotyl-Gravitropismus von *agd12-9*, *ehb1-2* und den dazugehörigen isogenen Wildtypen. Dagegen hatte die Veränderung der CaCl₂-Konzentration keinen signifikanten Einfluss.

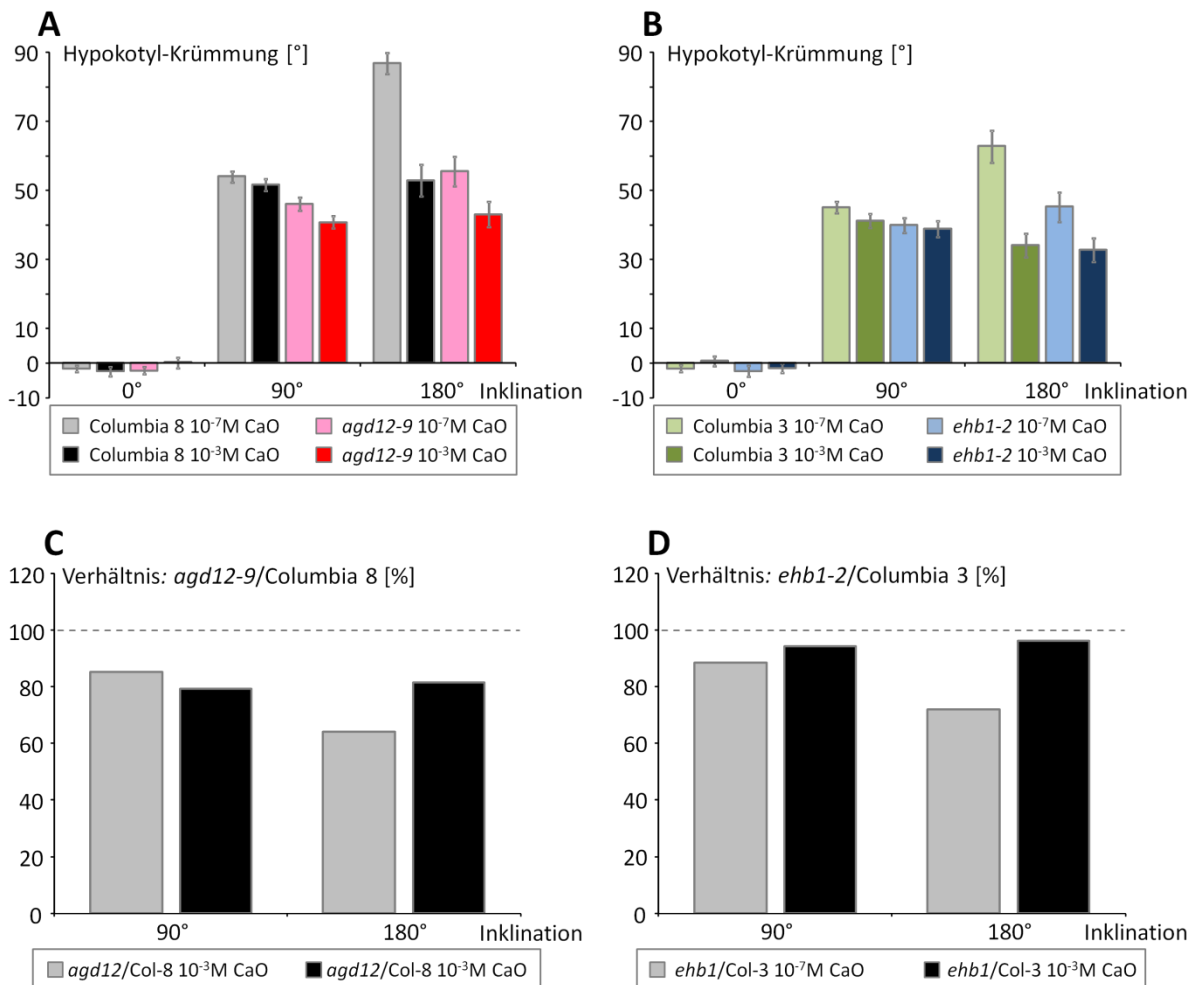


Abbildung 34: Hypokotyl-Gravitropismus von *agd12-9* und *ehb1-2* in Abhängigkeit von CaO

Hypokotyl-Krümmung 4 Tage alter Keimlinge von (A) *agd12-9* und seinem isogenen Wildtyp Columbia 8 sowie (B) *ehb1-2* und seinem isogenen Wildtyp Columbia 3 nach 24 Stunden Inklination um 90° bzw. 180°. Keimlinge wuchsen auf alternativem ½ MS-Phytigel mit zusätzlich 10^{-7} M bzw. 10^{-3} M CaO. Hypokotyl-Krümmung von 32 bis 75 Keimlingen wurde mittels Imagetool bestimmt und daraus resultierende Mittelwerte mit Standardfehlern versehen. (C und D) Verhältnis zwischen Mutante und Wildtyp, wobei 100% der Krümmung des Wildtyps entsprechen.

Abbildung 34 zeigt den Hypokotyl-Gravitropismus von *agd12-9* und Columbia 8 sowie *ehb1-2* und Columbia 3 nach eintägiger Inklination von 90° und 180° in Abhängigkeit von CaO. Dabei wurde deutlich, dass eine Erhöhung der CaO-Konzentration zu einem verringerten Hypokotyl-Gravitropismus bei allen Genotypen führt. Im Speziellen zeigte sich nach 90° Inklination kein Einfluss von CaO auf den *agd12-9*-Phänotyp (Abb. 34C). Dies wurde durch den geringen Effekt unterschiedlicher CaO-Konzentration auf die Hypokotyl-Krümmung verursacht. Bei einer Inklination von 180° nahm der Einfluss von CaO dagegen zu (Abb. 34A). Dabei wurde *agd12-9* weniger durch unterschiedliche CaO-Konzentrationen beeinflusst. Als Folge dessen hatte der *agd12-9*-Phänotyp seine stärkste Ausprägung bei geringer CaO-Konzentration nach 180° Inklination (Abb. 34C).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei *ehb1-2* und Columbia 3. So hatte auch hier CaO keinen nennenswerten Einfluss auf den Hypokotyl-Gravitropismus nach 90° Inklination (Abb. 34B). Nach einer Inklination von 180° zeigten Hypokotyle beider Genotypen jedoch eine verstärkte Krümmung bei geringerer CaO-Konzentration. Dabei wurde auch hier die Mutante *ehb1-2* durch unterschiedliche CaO-Kon-

zentrationen weniger beeinflusst. So zeigte sich bei geringeren CaO -Konzentrationen und 180° Inklination bei *ehb1-2* ein starker hypogravitroper Phänotyp (Abb. 34D). Zusammenfassend zeigte sich für Hypokotyle von *agd12-9* und *ehb1-2* ein hypogravitroper Phänotyp, der bei geringer CaO -Konzentration und hohen Inklinationswinkeln besonders ausgeprägt war.

4. 4. 4. Wurzelgravitropismus in Abhängigkeit von Calcium

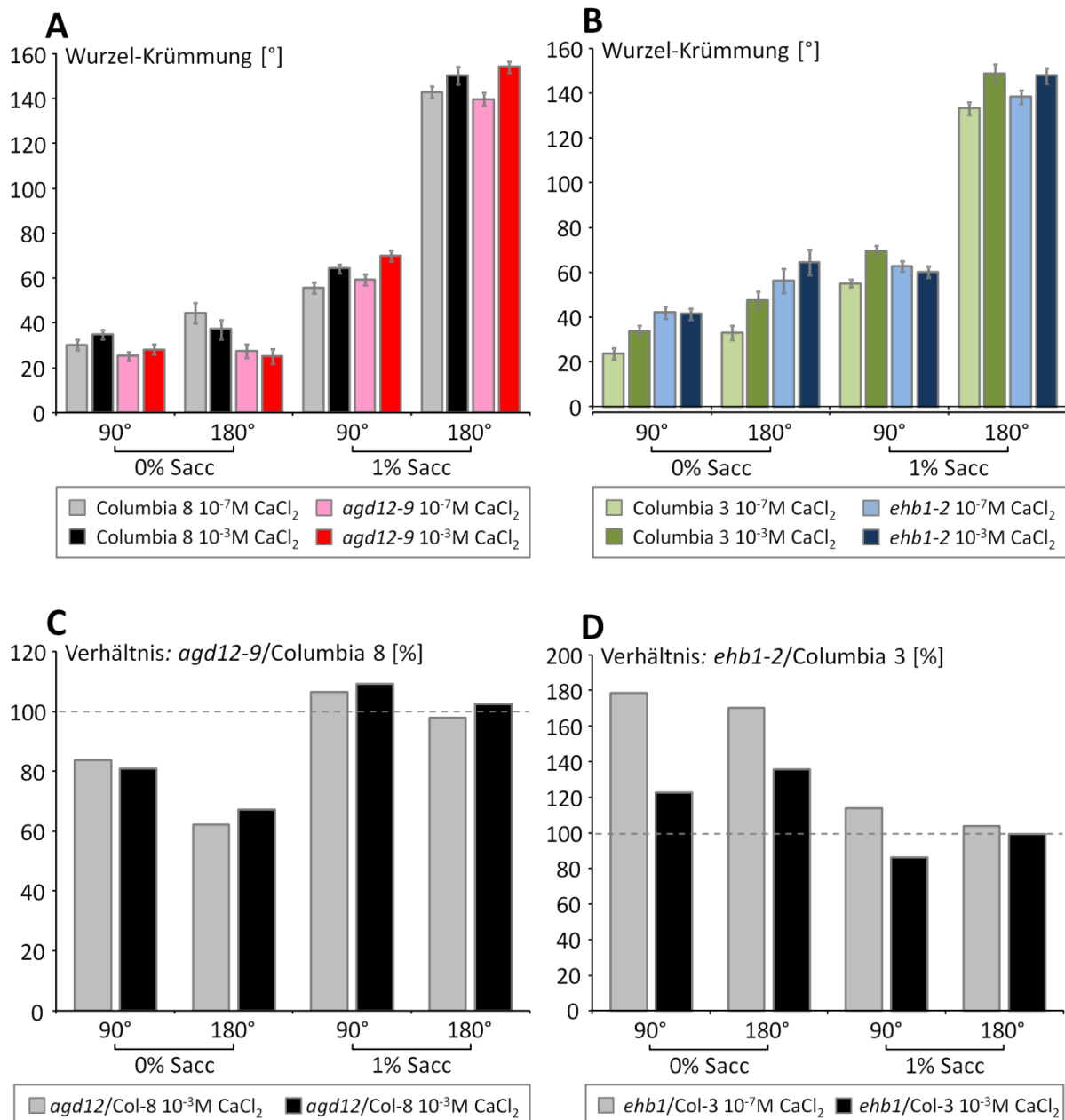


Abbildung 35: Wurzelgravitropismus von *agd12-9* und *ehb1-2* in Abhängigkeit von Saccharose und CaCl_2

Krümmung der Wurzel 4 Tage alter Keimlinge von (A) *agd12-9* und seinem isogenen Wildtyp Columbia 8 sowie (B) *ehb1-2* und seinem isogenen Wildtyp Columbia 3 nach 24 Stunden Inklination um 90° bzw. 180° . Keimlinge wuchsen auf Ca^{2+} -Minimalmedium mit 10^{-7}M bzw. 10^{-3}M CaCl_2 sowie 0% bzw. 1% Saccharose. Wurzelkrümmung von 42 bis 73 Keimlingen wurde mittels Imagetool bestimmt und die daraus resultierenden Mittelwerte inklusive Standardfehler abgebildet. (C und D) Verhältnis zwischen Mutante und Wildtyp, wobei 100% der Krümmung des Wildtyps entsprechen. Publiziert in Dümmer et al., 2016 (Figure 4).

Abbildung 35 veranschaulicht den Wurzelgravitropismus von *agd12-9* und Columbia 8 sowie *ehb1-2* und Columbia 3 in Abhängigkeit von CaCl_2 und Saccharose nach eintägiger Inklinatation von 90° und 180° . Dabei zeigten sich im Fall von *agd12-9* und Columbia 8 Unterschiede zwischen beiden Genotypen sowohl in Abhängigkeit zu CaCl_2 , zum Inklinationswinkel und Saccharose (Abb. 35A). In Abwesenheit von Saccharose zeigte nur Columbia 8 als Folge einer Erhöhung des Inklinationswinkels von 90° auf 180° verstärkte Wurzelkrümmung. Die Mutante *agd12-9* krümmte hingegen nach 90° Inklinatation ähnlich stark wie nach 180° Inklinatation. Ohne Saccharose nahmen die Unterschiede zwischen *agd12-9* und Columbia 8 somit nach 180° Inklinatation zu (Abb. 35C). Eine Abhängigkeit zwischen Phänotyp und CaCl_2 -Konzentration war dabei nicht zu erkennen. Jedoch wurde der Gravitropismus von *agd12-9* weniger durch Änderung der CaCl_2 -Konzentration beeinflusst als der Gravitropismus von Columbia 3. In Anwesenheit von 1 % Saccharose reagierten beide Genotypen mit allgemein stärkerem Wurzel-Gravitropismus. Zudem zeigten beide eine verstärkte Krümmung als Folge erhöhter Inklinatation um 180° . Dabei hatte eine erhöhte CaCl_2 -Konzentration eine leicht erhöhte gravitrope Reaktion beider Linien zur Folge (Abb. 35A). Die Ausprägung des hypogravitropen Phänotyps, der sich bei 1% Saccharose normalisierte, wurde davon allerdings nicht beeinflusst (Abb. 35C).

Im Fall der Mutante *ehb1-2* und Columbia 3 zeigte sich ebenso, dass höhere CaCl_2 -Konzentrationen den Wurzelgravitropismus fördern. Dabei reagierte *ehb1-2* weit weniger sensitiv gegenüber einer Erhöhung der CaCl_2 -Konzentration. Zudem verstärkten auch hier höhere Inklinationswinkel und Saccharose die gravitrope Reaktion (Abb. 35B). Abschließend zeigte sich der bereits beschriebene hypogravitrope *ehb1-2*-Phänotyp der Wurzel vor allem in Abwesenheit von Saccharose bei geringen CaCl_2 -Konzentrationen (Abb. 35D). Schlussendlich wiesen die Wurzeln von *agd12-9* einen hypogravitropen und Wurzeln von *ehb1-2* einen hypergravitropen Phänotyp auf. Dabei wurde die Wurzelkrümmung beider Mutanten durch Änderungen der CaCl_2 -Konzentration weniger beeinflusst als die Wurzelkrümmung der dazugehörigen isogenen Wildtypen.

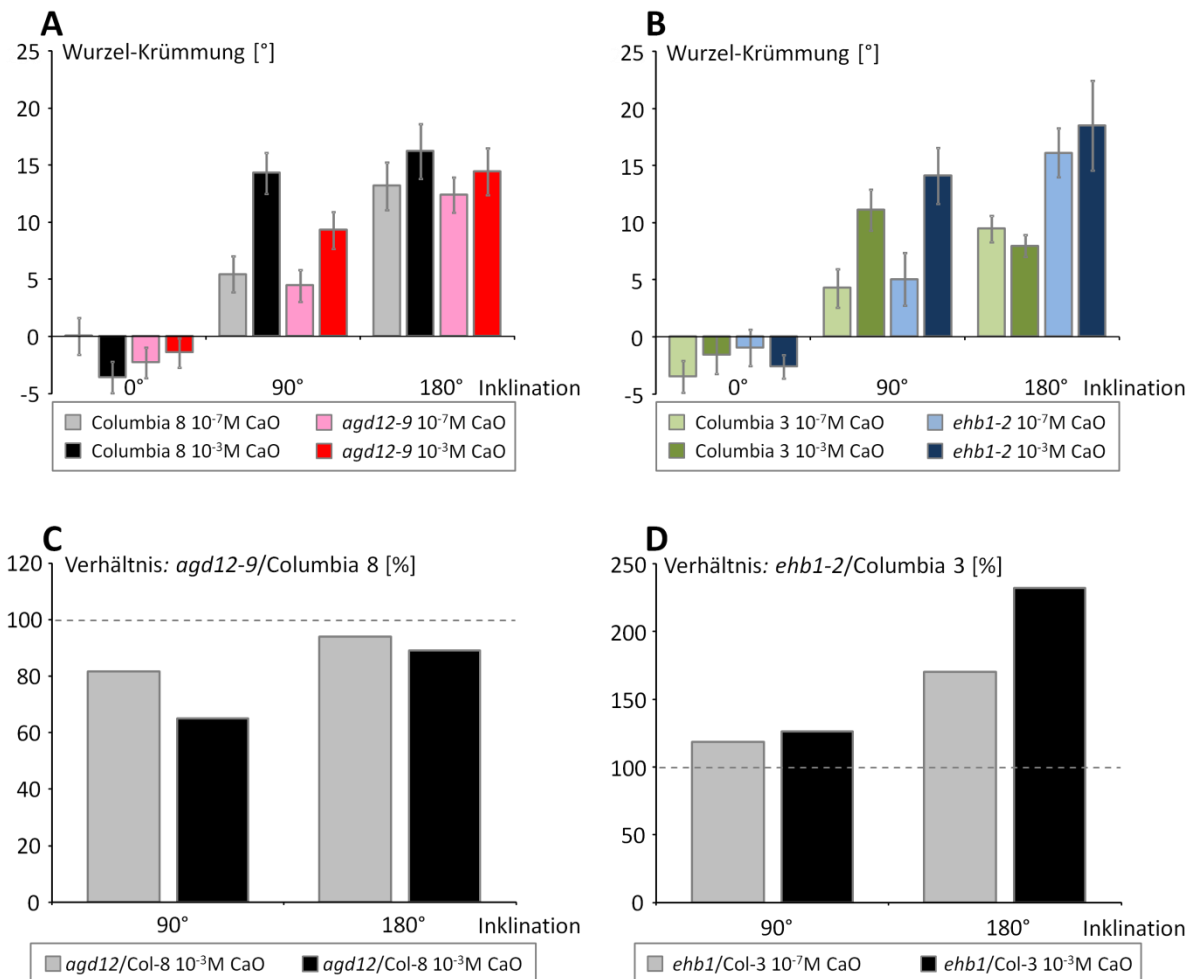


Abbildung 36: Wurzelgravitropismus von *agd12-9* und *ehb1-2* in Abhängigkeit von CaO

Krümmung der Wurzel 4 Tage alter Keimlinge von (A) *agd12-9* und deren Wildtyp Columbia 8 sowie (B) *ehb1-2* und deren Wildtyp Columbia 3 nach 24 Stunden Inklination um 90° bzw. 180°. Gewachsen auf alternativem ½ MS-Phytigel mit 10^{-7} M bzw. 10^{-3} M CaO. Wurzel-Krümmung von 32 bis 75 Keimlingen wurde mittels Imagetool bestimmt und die daraus resultierenden Mittelwerte mit Standardfehlern abgebildet. (C und D) Verhältnis zwischen Mutante und Wildtyp, wobei 100% der Krümmung des Wildtyps entsprechen.

Abbildung 36 zeigt den Wurzelgravitropismus von *agd12-9* und Columbia 8 sowie *ehb1-2* und Columbia 3 nach eintägiger Inklination von 90° und 180° in Abhängigkeit von CaO. Dabei wurde deutlich, dass eine Erhöhung der CaO-Konzentration zu einem erhöhten Wurzelgravitropismus bei allen untersuchten Linien führt. So waren bei geringen CaO-Konzentrationen nach 90° Inklination nur sehr geringe Krümmungswerte zu verzeichnen (Abb. 36A und B). Höhere CaO-Konzentrationen führten zu einer verstärkten Ausprägung der Phänotypen von *agd12-9* und *ehb1-2* (Abb. 36C und D), wobei sich der hypogravitrope *agd12-9*-Phänotyp vor allem nach 90° Inklination zeigte. Der hypergravitrope *ehb1-2*-Phänotyp hingegen zeigte sich verstärkt nach 180° Inklination. Damit führte eine erhöhte CaO-Konzentration, ähnlich einer Erhöhung der CaCl_2 -Konzentration, zu verstärkter Wurzelkrümmung und zu einer stärkeren Ausprägung des hypogravitropen *agd12-9*-Phänotyps sowie des hypergravitropen *ehb1-2*-Phänotyps.

4. 4. 5. Hypokotyl-Phototropismus in Abhängigkeit von Calcium

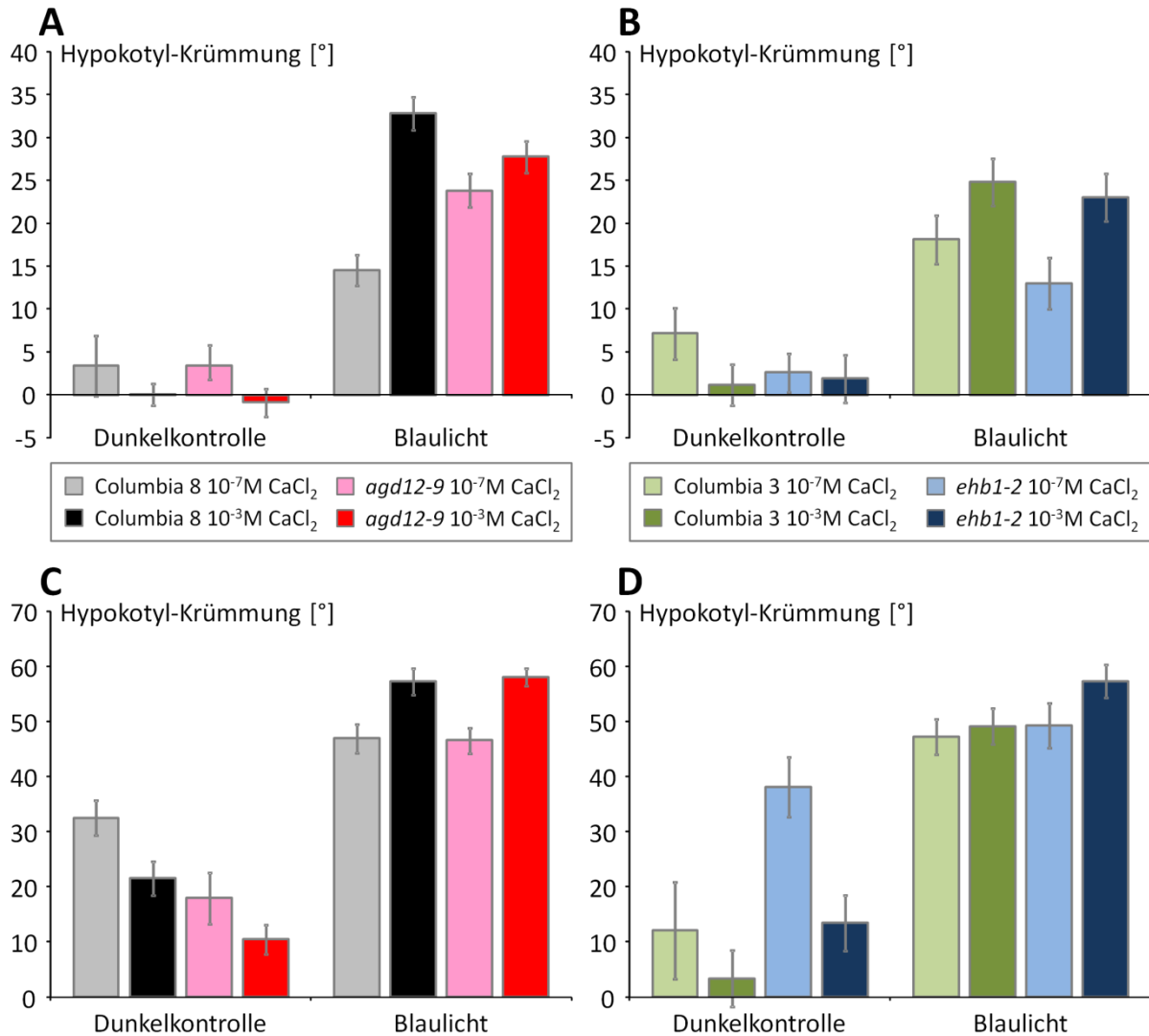


Abbildung 37: Hypokotyl-Phototropismus von *agd12-9* und *ehb1-2* in Abhängigkeit von CaCl₂

Krümmung von Hypokotylen 4 Tage alter Keimlinge von (A und C) *agd12-9* und dessen Wildtyp Columbia 8 sowie (B und D) *ehb1-2* und dessen Wildtyp Columbia 3 nach 24 Stunden lateraler Belichtung. Keimlinge wuchsen auf Ca²⁺-Minimalmedium mit 10⁻⁷ M bzw. 10⁻³ M CaCl₂. Belichtung mit 10⁻⁴ μmol/m²s Blaulicht mit λ_{max} = 465 nm in (A und B) statischer bzw. (C und D) clinostatisierter Strahlteilerbox inklusive Dunkelkontrollen. Hypokotyl-Krümmung von 34 bis 106 Keimlingen wurde mittels Imagetool bestimmt und die daraus resultierenden Mittelwerte mit Standardfehlern abgebildet. Publiziert in Michalski et al., 2017 (Figure 7).

Abbildung 37 zeigt den Hypokotyl-Phototropismus von *agd12-9* und Columbia 8 sowie *ehb1-2* und Columbia 3 in Abhängigkeit zu CaCl₂ nach eintägiger Blaulichtbestrahlung in statischer und clinostatisierter Strahlteilerbox. Dabei wurde deutlich, dass eine erhöhte CaCl₂-Konzentration zu einer erhöhten phototropen Reaktion aller Genotypen führt. Zudem zeigten clinostatisierte Keimlinge eine allgemein stärkere Krümmung als Keimlinge aus der statischen Strahlteilerbox. Bei den jeweiligen Dunkelkontrollen wurden hingegen bei geringer CaCl₂-Konzentration stärkere Hypokotyl-Krümmungen mit teilweise sehr hohen Werten nach Clinostatisierung gemessen.

Im Fall von *agd12-9* in einer statischen Strahlteilerbox zeigte sich eine hyperphototrope Reaktion für geringe bzw. hypophototrope Reaktion für hohe CaCl_2 -Konzentrationen (Abb. 37A). Unter Clinostat-Bedingungen hoben sich diese Unterschiede komplett auf (Abb. 37C). Jedoch zeigten dazugehörige Dunkelkontrollen eine unerwartet starke Krümmung, die mit abnehmender CaCl_2 -Konzentration zunahm und bei Columbia 8 stärker ausgeprägt war. Im Fall von *ehb1-2* und Columbia 3 zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 37B und D). So normalisierte sich der zuvor hypophototrope Phänotyp von *ehb1-2* durch Clinostatisierung. Einzig *ehb1-2* reagierte bei höheren CaCl_2 -Konzentrationen nun hyperphototrop. Zudem zeigten entsprechende Dunkelkontrollen bei geringen CaCl_2 -Konzentrationen auch hier eine erhöhte Krümmung nach Clinostatisierung, wobei vor allem *ehb1-2* bei geringer CaCl_2 -Konzentration durch ein hypergravitropes Verhalten hervorstach.

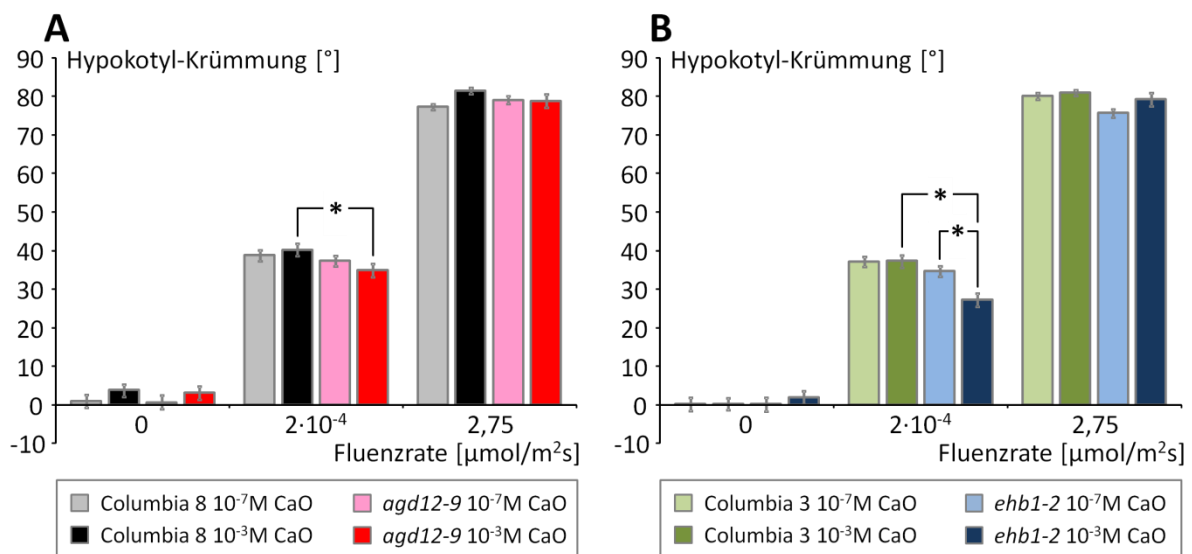


Abbildung 38: Hypokotyl-Phototropismus von *agd12-9* und *ehb1-2* in Abhängigkeit von CaO

Hypokotyl-Krümmung 4 Tage alter Keimlinge von (A) *agd12-9* und Wildtyp Columbia 8 sowie (B) *ehb1-2* und Wildtyp Columbia 3 nach 24 Stunden lateraler Belichtung. Gewachsen auf alternativem ½ MS-Phytigel mit 10^{-7} M bzw. 10^{-3} M CaO. Belichtung mit $2 \cdot 10^{-4}$ bzw. $2,74 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blaulicht mit $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$, inklusive Dunkelkontrollen. Hypokotyl-Krümmung von 79 bis 127 Keimlingen wurde mittels Imagetool bestimmt und die daraus resultierenden Mittelwerte mit Standardfehlern abgebildet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Mittelwerten wurden mittels ANOVA bestimmt und mit Stern markiert.

Abbildung 38 zeigt den Hypokotyl-Phototropismus von *agd12-9* und Columbia 8 sowie *ehb1-2* und Columbia 3, nach eintägiger Blaulichtbestrahlung in einer statischen Strahlteilerbox in Abhängigkeit zu CaO. Dabei zeigte sich nur bei geringen Fluenzraten und hoher CaO-Konzentration ein hypophototroper Phänotyp für *agd12-9* (Abb. 38A). Geringere CaO-Konzentrationen oder höhere Fluenzraten führten zu einer Angleichung der Hypokotyl-Krümmung von *agd12-9* und Columbia 8. Ähnlich verhielt sich *ehb1-2*, welches allerdings bei geringen Fluenzraten und hoher CaO-Konzentration einen deutlich hypophototropen Phänotyp aufwies.

Zusammenfassend wurde deutlich, dass *agd12-9* und *ehb1-2* bei hohen Konzentrationen von CaCl_2 sowie CaO einen hypophototropen Phänotyp aufwiesen. Dieser kehrte sich im Fall von *agd12-9* bei geringer CaCl_2 -Konzentration jedoch um. Zudem näherten sich die Krümmungswinkel von Mutanten und Wildtypen im Zuge einer parallel erfolgten Clinostatisierung größtenteils an, wobei die dazugehörigen Dunkelkontrollen von *agd12-9* hypogravitrop bzw. von *ehb1-2* hypergravitrop reagierten, was vor allem bei geringer CaCl_2 -Konzentration deutlich wurde.

4. 5. Überexpression von AGD12 und dessen Homologen

4. 5. 1. Erstellte Expressionsvektoren für GFP-Fusionsproteine

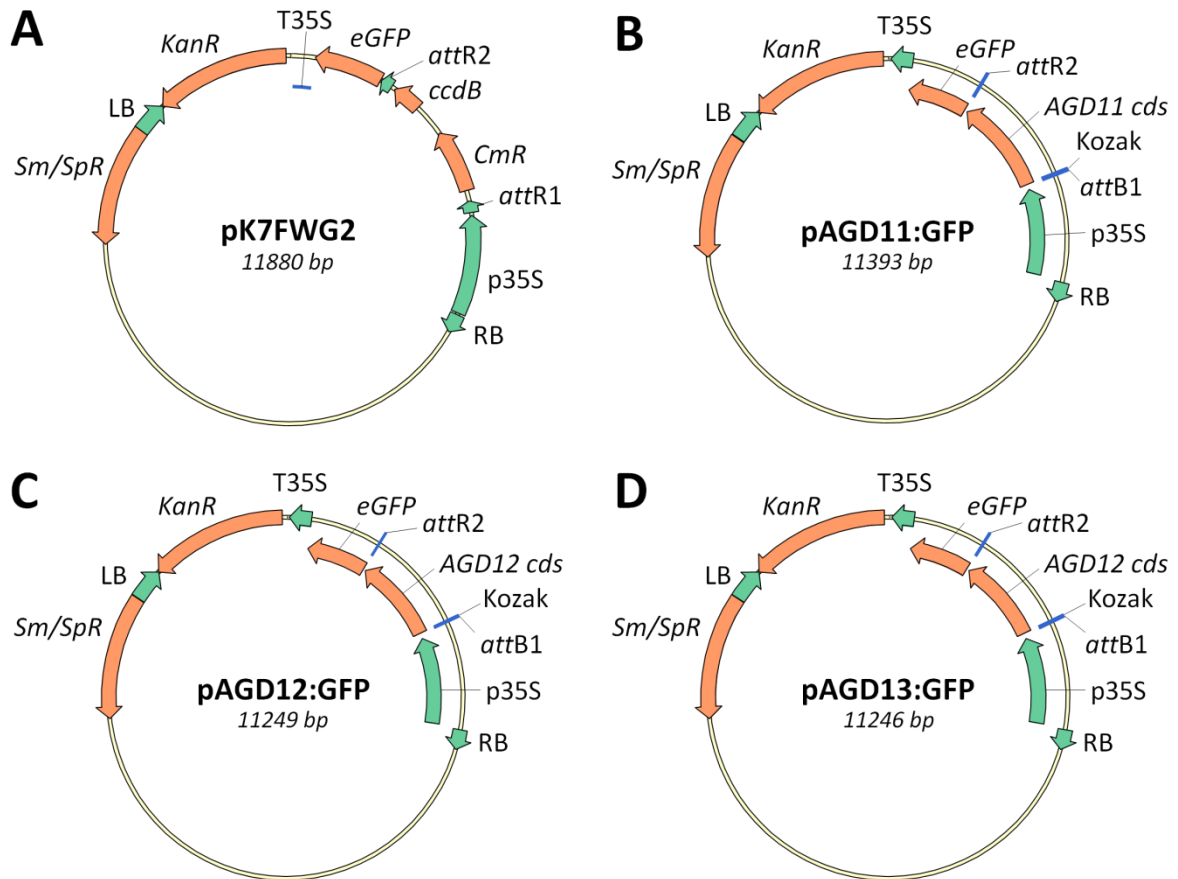


Abbildung 39: Erstellte Vektoren zur Überexpression von AGD:GFP-Fusionsproteinen

Vektorkarten des (A) Leervektors pK7FWG2 sowie die daraus entwickelten Expressionsvektoren (B) pAGD11:GFP, (C) pAGD12:GFP und (D) pAGD13:GFP. Codierende Sequenzabschnitte sind orange markiert: Sequenzen für *eGFP*, den letalen Gyrasehemmer *ccdB*, *AGD11*, *AGD12* und *AGD13* sowie die im Vektor bereits vorhandenen Resistenzen gegen Streptomycin/Spectinomycin (*Sm/SpR*), Kanamycin (*KanR*) und Chloramphenicol (*CmR*). Nicht-codierende Funktionselemente sind grün bzw. blau markiert: 35S-Promotor (*p35S*), 35S-Terminator (*T35S*), *attR1/2*-Sequenzen zur Gateway-Klonierung sowie *right* und *left border* (*RB/LB*) zur Abgrenzung der T-DNA.

Abbildung 39 zeigt Vektorkarten des Leer- bzw. Destination-Vektors pK7FWG2 (Bhaskar et al., 2009), sowie die drei daraus erstellten Expressionsvektoren pAGD11:GFP, pAGD12:GFP und pAGD13:GFP als Resultat einer erfolgreichen Gateway-Klonierung. Dabei wurden die codierenden Sequenzen der Gene *AGD11*, *AGD12* und *AGD13* in pK7FWG2 als GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle eines konstitutiven eukaryotischen Promotors eingebracht. Die so entstandenen drei Vektoren dienen der Expression von Fusionsproteinen mit C-terminalem GFP *in planta*. Die Selektion erfolgte bei erfolgreicher Transformation in *E. coli* und *A. tumefaciens* über eine Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz. In *Arabidopsis thaliana* war eine Selektion über die in der T-DNA enthaltene Kanamycin-Resistenz möglich.

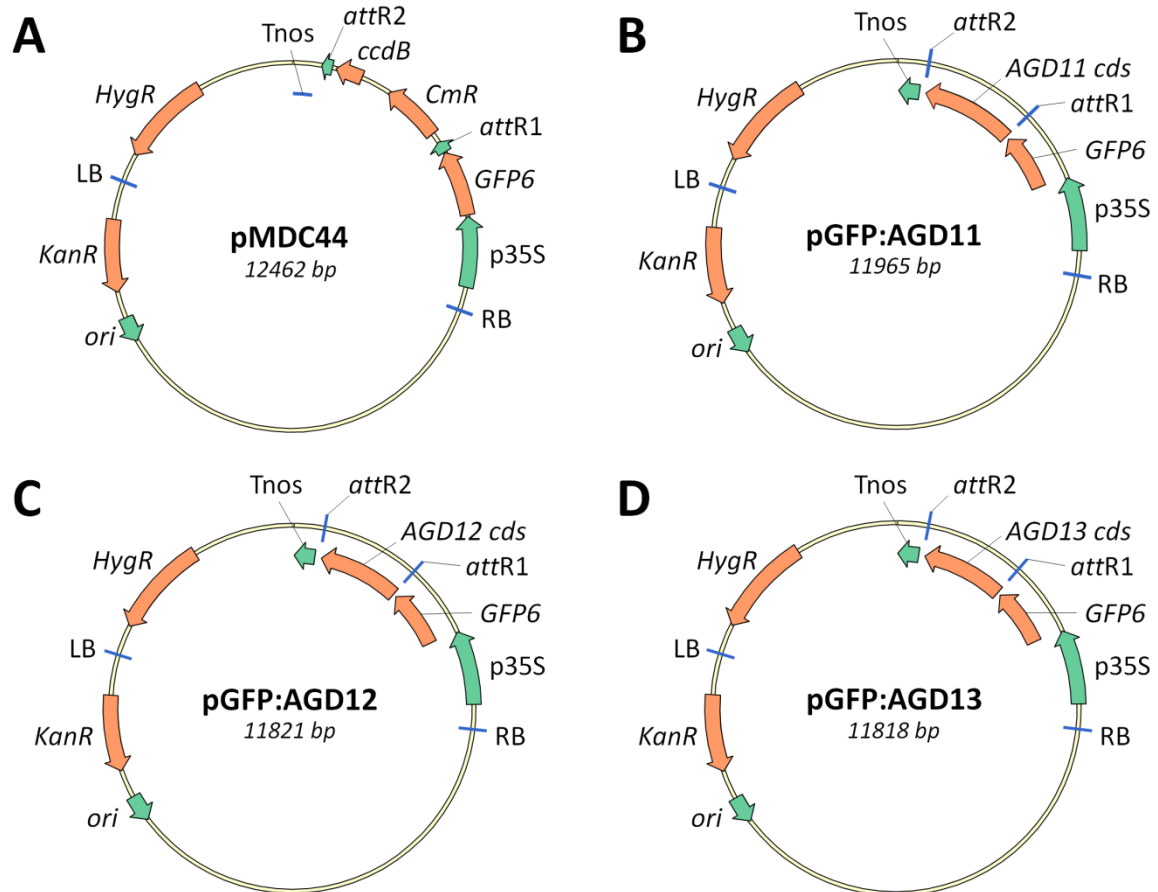


Abbildung 40: Erstellte Vektoren zur Überexpression von GFP:AGD-Fusionsproteinen

Vektorkarten des (A) Leervektors pMDC44 sowie die daraus entwickelten Expressionsvektoren (B) pGFP:AGD11, (C) pGFP:AGD12 und (D) pGFP:AGD13. Codierende Sequenzabschnitte sind orange markiert: Sequenzen für GFP6, den letalen Gyrasehemmer *ccdB*, AGD11, AGD12 und AGD13 sowie Resistenzen gegen Hygromycin (*HygR*), Kanamycin (*KanR*) und Chloramphenicol (*CmR*). Nicht-codierende Funktionselemente sind grün bzw. blau markiert: Replikationsursprung (*ori*), 35S-Promotor (*p35S*), Nopalinsynthase-Terminator (*Tnos*), *attR1/2*-Sequenzen zur Gateway-Klonierung sowie *right* und *left border* (RB/LB) zur Abgrenzung der T-DNA.

Die in Abbildung 40 dargestellten Vektorkarten zeigen den Leer- bzw. *Destination*-Vektor pMDC44 (Curtis und Grossniklaus, 2003) sowie die drei daraus erstellten Expressionsvektoren pGFP:AGD11, pGFP:AGD12 und pGFP:AGD13 als Resultat einer erfolgreichen Gateway-Klonierung. Analog zu den oben beschriebenen AGD:GFP Konstrukten wurden die codierenden Sequenzen der Gene AGD11, AGD12 und AGD13 so in pMDC44 eingebracht, dass ein GFP-AGD Fusionsprotein entstand. Die so entstandenen drei Vektoren dienen ebenfalls der Expression von Fusionsproteinen *in planta*. Die Selektion erfolgte bei erfolgreicher Transformation in *E. coli* und *A. tumefaciens* über eine Kanamycin-Resistenz. In *Arabidopsis thaliana* war eine Selektion über die in der T-DNA enthaltene Hygromycin-Resistenz möglich.

4. 5. 2. AGD12-Überexpression in *N. benthamiana*

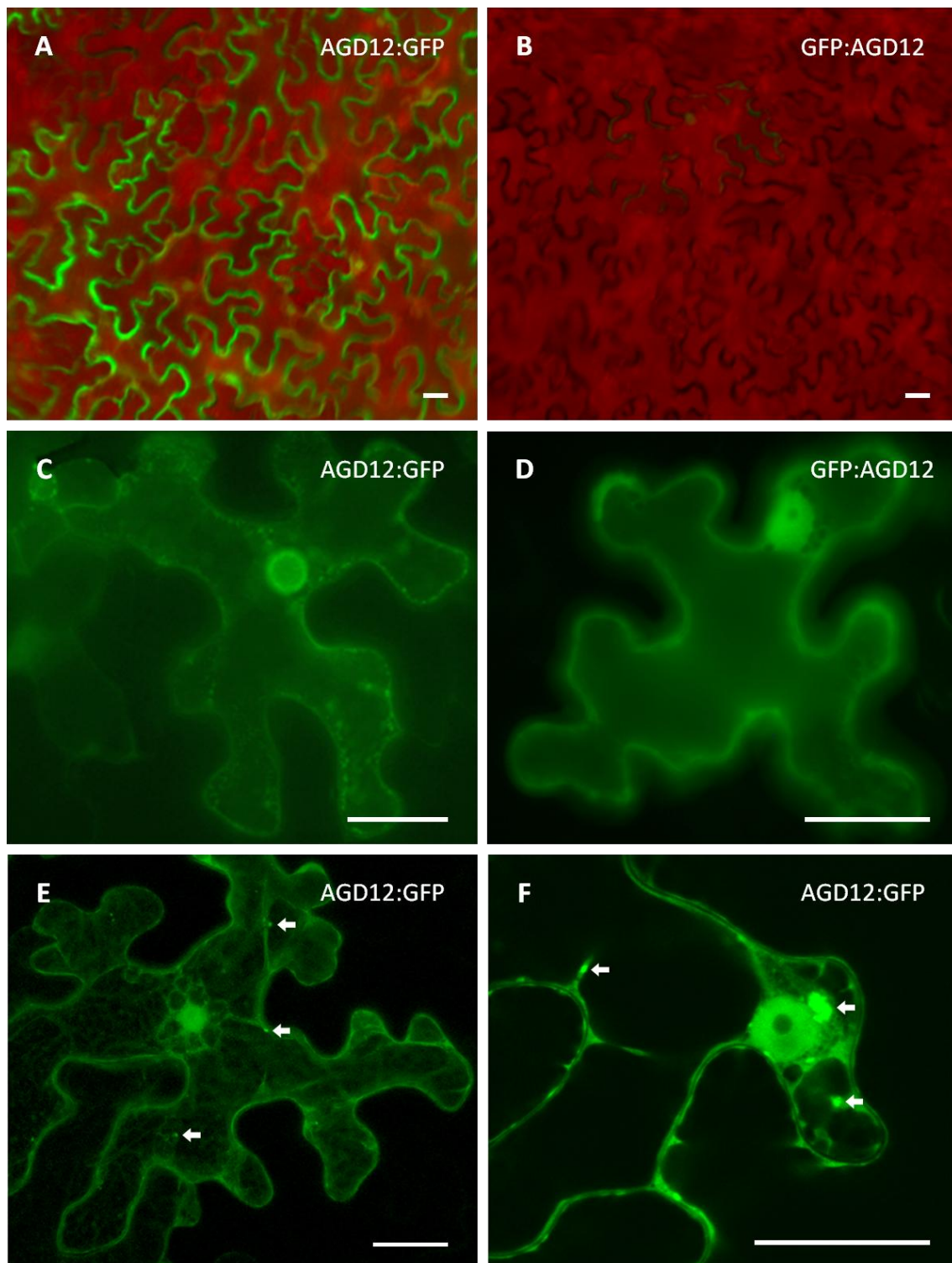


Abbildung 41: Expression von AGD12:GPF und GFP:AGD12 in Tabak-Epidermiszellen

GFP-Fluoreszenz in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* nach 3 bis 5 Tagen Expression der Genkonstrukte (A, C, E und D) AGD12:GFP und (B und D) GFP:AGD12 nach transienter Transformation mittels *A. tumefaciens*. Epifluoreszenz-Aufnahmen (A und B) transformierter Gewebe ohne KIF590-Filter sowie von (C und D) Einzelzellen mit KIF590-Filter zur Tilgung der Chlorophyll-Autofluoreszenz. (E und F) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von AGD12:GFP in Epidermiszellen beinhalten Pfeile zur Markierung erhöhter Fluoreszenz. Größenstandards entsprechen 30 µm.

Abbildung 41 zeigt GFP-Fluoreszenz in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* nach transienter Transformation von Tabakblättern mit den Expressionsvektoren pAGD12:GFP (Abb. 41A, C, E und D) bzw. pGFP:AGD12 (Abb. 41B und D). Bei allen Transformationsansätzen zeigte sich eine GFP-Fluoreszenz, welche auf die Existenz eines funktionalen Fusionsproteins AGD12:GFP bzw. GFP:AGD12 deutete. Beide Genkonstrukte wiesen jedoch unterschiedlich hohe Fluoreszenzsignale auf (Abb. 41A und B). So zeigten mit pAGD12:GFP transfizierte Blätter große Gewebebereiche mit intensiver grüner GFP-Fluoreszenz. Diese überstrahlten in weiten Teilen die rote Chlorophyll-Autofluoreszenz (Abb. 41A). Transfektionen mit pGFP:AGD12 wiesen hingegen nur schwache Fluoreszenzsignale bei sehr wenigen Zellen der Blattepidermis auf (Abb. 41B).

Die Verteilung der GFP-Fluoreszenz innerhalb der Zelle war bei beiden Genkonstrukten jedoch ähnlich (Abb. 41C und D). So war in beiden Fällen der Zellkern Ort der stärksten Fluoreszenz und lässt bei einigen Aufnahmen den darin enthaltenen Nucleolus erkennen (Abb. 41D und F). Neben der Akkumulation im Zellkern waren die betreffenden Fusionsproteine zudem auch im Randbereich der Epidermiszellen vorzufinden. Vereinzelt durch GFP-Fluoreszenz erkennbare Plasmabrücken sowie schwankende Fluoreszenz-Stärke an den Zellrändern deuteten auch auf eine Lokalisation innerhalb des Cytoplasmas hin. Eine zusätzliche Lokalisation beider Fusionsproteine in der Zellmembran war angesichts dieser Fluoreszenz-Verteilung ebenso möglich.

Des Weiteren zeigten konfokal-mikroskopische Aufnahmen der mit pAGD12:GFP transformierten Zellen vereinzelt starke Akkumulationen von GFP außerhalb des Zellkerns (Abb. 41E und F). Diese ließen sich bereits unter dem Epifluoreszenzmikroskop erahnen (Abb. 41C) und konnten mittels Konfokalmikroskop im Bereich des Cytoplasmas lokalisiert werden (Abb. 41F). Dem entgegen zeigte sich nach transienter Transformation von Tabakblättern mit den Leervektoren pMDC44 (Curtis und Grossniklaus, 2003) sowie pK7FWG2 (Karimi et al., 2002) keinerlei Fluoreszenz.

Zusammenfassend konnten sowohl AGD12:GFP als auch GFP:AGD12 bei Tabak-Epidermiszellen im Bereich des Zellkerns, Cytoplasmas und Plasmamembran lokalisiert werden. Dabei zeigte AGD12:GFP Akkumulate im Bereich des Cytoplasmas auf. Wogegen GFP:AGD12 im Vergleich zu AGD12:GFP eine deutlich geringere Expression aufwies.

4. 5. 3. Übersicht erstellter und gekreuzter Überexpressionslinien in *Arabidopsis*

Tabelle 21: Übersicht der erstellten T-DNA-Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana*

T-Plasmid	T1-Pflanzen	T2-Population	T3-Population
pK7FWG2	K7FWG2 #1 - #6	#1 - #6	/
pAGD11:GFP	AGD11:GFP #1 - #12	#1 - #12	/
pAGD12:GFP	AGD12:GFP #1 - #6	#2A - #4	#2A - #2K, #3A - #3K, #4A - #4K davon homozygote: 2C, 2E, 2K, 3A, 3E, 4D, 4E, 4F, 4J
pAGD13:GFP	AGD13:GFP #1 - #3	#1 - #3	/
pMDC44	MDC44 #1 - #4	#1 - #4	/
pGFP:AGD11	GFP:AGD11 #1 - #4	#1 - #4	/
pGFP:AGD12	GFP:AGD12 #1 - #3	#1 - #3	#1A - #1J, #3A
pGFP:AGD13	GFP:AGD11 #1 - #7	#1 - #7	/

Tabelle 22: Übersicht der erstellten AGD12-Komplementationen und DR5::GUS-Kreuzungen

Trafo/Kreuzung	T1-Pflanzen/Population	T2-Population	T3-Population
AGD12:GFP in <i>agd12-9</i>	AGD12:GFPcompl #1 - #6	#1 - #3	#2A - #2G, #3A - #3E
GFP:AGD12 in <i>agd12-9</i>	GFP:AGD12compl #1 - #6	#1 - #2	#1A - #1F, #2A - #2H
Columbia 8 × DR5::GUS	DR5::GUS in Col-8 #1 - #7	#1 - #7	/
AGD11:GFP × DR5::GUS	DR5::GUS in AGD11:GFP	/	/
AGD12:GFP × DR5::GUS	DR5::GUS in AGD12:GFP #1 - #7	#1 - #7	/
AGD13:GFP × DR5::GUS	DR5::GUS in AGD13:GFP	/	/
GFP:AGD11 × DR5::GUS	DR5::GUS in GFP: AGD11	/	/
GFP:AGD12 × DR5::GUS	DR5::GUS in GFP: AGD12	/	/
GFP:AGD13 × DR5::GUS	DR5::GUS in GFP: AGD13	/	/
Columbia Gi × DR5::GUS	DR5::GUS in ColGi #1 - #3	#1 - #3	/
MAM08 × DR5::GUS	DR5::GUS in MAM08	/	/
<i>nph3</i> × DR5::GUS	DR5::GUS in <i>nph3</i>	/	/

4. 5. 4. Lokalisation von AGD12:GFP und EHB1:GFP in *Arabidopsis thaliana*

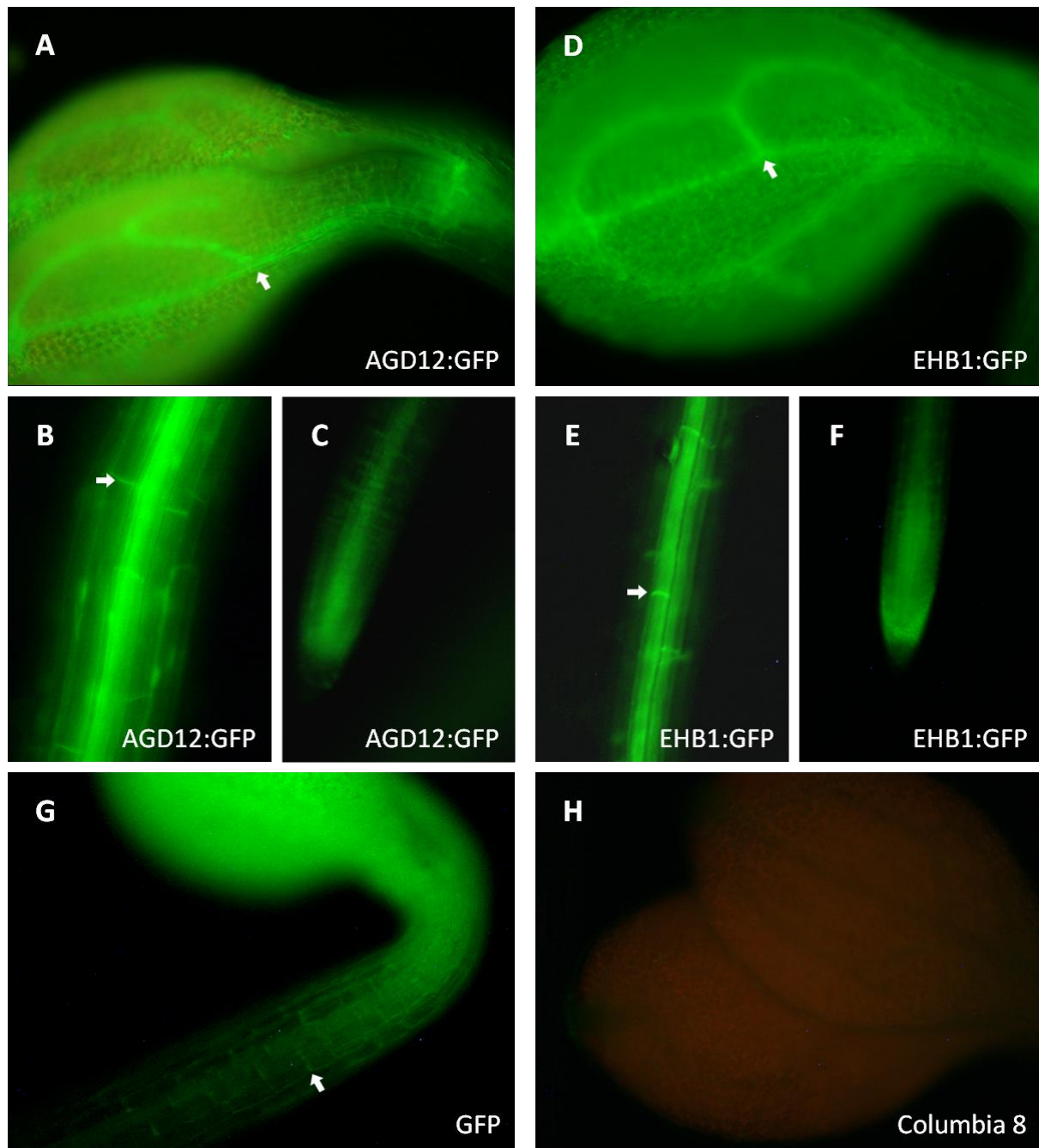


Abbildung 42: Expression von AGD12:GFP, EHB1:GFP und GFP in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana*

Expression von GFP-Fusionsproteinen, unter Kontrolle eines 35S-Promotors in 4 Tage alten Keimlingen. Expression von AGD12:GFP in (A) Keimblättern, (B) Wurzel und (C) Wurzelspitze. Expression von EHB1:GFP in (D) Keimblättern, (E) Wurzel und (F) Wurzelspitze. (G) GFP-Kontrolle und (H) Wildtyp Columbia 8. Pfeile weisen auf erhöhte Fluoreszenz (A, D) in Leitgeweben bzw. (B, E, G) in longitudinalen Zellbereichen hin.

Abbildung 42 zeigt die Expression von AGD12-, sowie EHB1:GFP-Fusionsproteinen und einer GFP-Kontrolle in 4 Tage alten Keimlingen von *Arabidopsis thaliana*. Wie für den Einsatz eines 35S-Promotors üblich, zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz in jedem Gewebe. Dabei wiesen beide Fusionskonstrukte eine ähnliche Verteilung der Fluoreszenz wie bei GFP-Kontrollpflanzen auf (Abb.

42G). So zeigten Keimlinge mit Expression von AGD12:GFP, EHB1:GFP und GFP eine erwartungsgemäß starke Fluoreszenz in ihren Kotyledonen. Zudem zeichneten sich einige Tage nach der Keimung erste Leitgewebe ab, welche sich durch gesteigerte Fluoreszenz vom restlichen Blattgewebe abhoben (Abb. 42A und D). In jüngeren Keimlingen zeigte sich ein derartiges Muster noch nicht.

Die verstärkte Fluoreszenz in Leitgeweben setzte sich in Wurzeln und Wurzelspitzen weiter fort. So zeigte der Zentralzylinder der Wurzeln eine deutlich stärkere Fluoreszenz als das umliegende parenchymatische Gewebe (Abb. 42B und E). Dies resultierte letztlich in einer erhöhten Fluoreszenz in der gesamten Breite der Wurzelspitze (Abb. 42C und F). Dabei war diese erhöhte Fluoreszenz jedoch nicht im vordersten Teil der Wurzelspitze, der Kalyptra, auszumachen. Vielmehr begrenzte sie sich auf die der Kalyptra nachgelagerte meristematische Zone um das ruhende Zentrum.

Auf zellulärer Ebene zeigte sich zudem eine erhöhte Fluoreszenz im longitudinalen Außenbereich von Zellen der Wurzel und des Hypokotyls. Diese Anreicherung des GFP-Fluoreszenzsignals im basalen und apikalen Zellrändern war bei Keimlingen mit Expression der Fusionsproteine AGD12:GFP, EHB1:GFP und GFP zu erkennen (Abb. 42B, E und G). Der Wildtyp Columbia 8 hingegen zeigte keinerlei störende durch Lignin verursachte grüne Auto-Fluoreszenz (Abb. 42H). Einzig die rote Fluoreszenz des in den Kotyledonen befindlichen Chlorophylls war zu erkennen. Diese nahm nach längerer Belichtung durch Chlorophyll-Neusynthese zu, wurde bei transformierten Keimlingen jedoch meist vom intensiven GFP-Signal überdeckt.

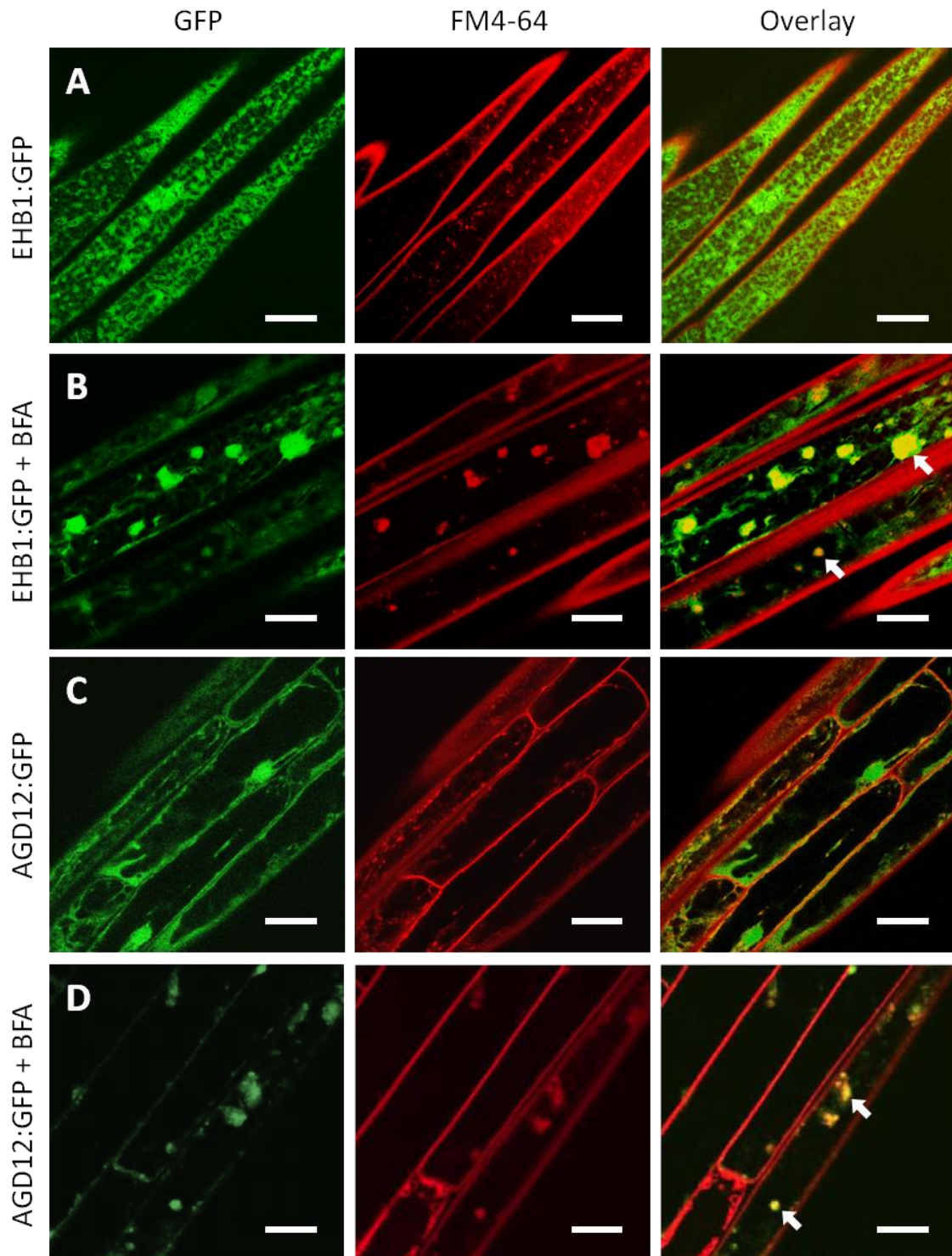


Abbildung 43: Subzelluläre Lokalisation von AGD12:GFP und EHB1:GFP in *Arabidopsis thaliana*

Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine AGD12:GFP, EHB1:GFP und des Membranfarbstoffs FM 4-64 in Hypokotylzellen von *Arabidopsis thaliana* mit und ohne Brefeldin A (BFA). Pfeile markieren BFA-Kompartimente. Größenstandard entspricht 20 μm (weißer Balken). Die EHB1:GFP-Linie wurde durch Marika Midon erstellt. Die AGD12:GFP-Linie wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Versuchsdurchführung und Dokumentation erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie durch Michaela Dümmer. Publiziert in Dümmer et al., 2016 (Figure 5).

Abbildung 43 zeigt die Lokalisation der Fusionsproteine AGD12:GFP und EHB1:GFP in Hypokotylzellen der entsprechenden Überexpressionslinien sowie die Auswirkungen der Behandlung mit FM 4-64 und

Brefeldin A. So war im Fall von AGD12:GFP und EHB1:GFP ein Fluoreszenzsignal im Bereich von Zellmembran und Cytoplasma zu erkennen (Abb. 43A und C). Dazugehörige Fluoreszenzsignale von FM 4-64 waren vor allem an Plasmamembran und punktuell innerhalb der Zelle vorzufinden. Nach Behandlung mit Brefeldin A nahm die gleichmäßige Verteilung von AGD12:GFP und EHB1:GFP innerhalb der Zelle ab (Abb. 43B und D). Die entsprechende Fluoreszenz verschob sich vom äußeren Zellbereich hin zum Zellinneren und bildete dort Aggregate. Dazugehörige Aufnahmen mit FM 4-64 zeigten erneut Fluoreszenz an der Plasmamembran. Statt zuvor nur punktueller Fluoreszenz im Zellinneren waren nun größere Ansammlungen von FM 4-64 zu erkennen. Diese durch BFA induzierten Kompartimente mit FM 4-64 waren im Overlay deckungsgleich mit der GFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine AGD12:GFP und EHB1:GFP.

Zusammenfassend wiesen die Fusionsproteine AGD12:GFP und EHB1:GFP eine vergleichbare Verteilung in *Arabidopsis thaliana* auf. So wurden beide Fusionsproteine auf Gewebsebene vermehrt in Kotyledonen, Leitgeweben und Wurzelspitzen dokumentiert. Auf Zellebene waren AGD12:GFP und EHB1:GFP im Bereich des Cytoplasmas, der Plasmamembran und in den durch BFA-induzierten Kompartimenten vorzufinden.

4. 5. 5. Untersuchungen zum Gravitropismus von AGD12-Überexpressionslinien

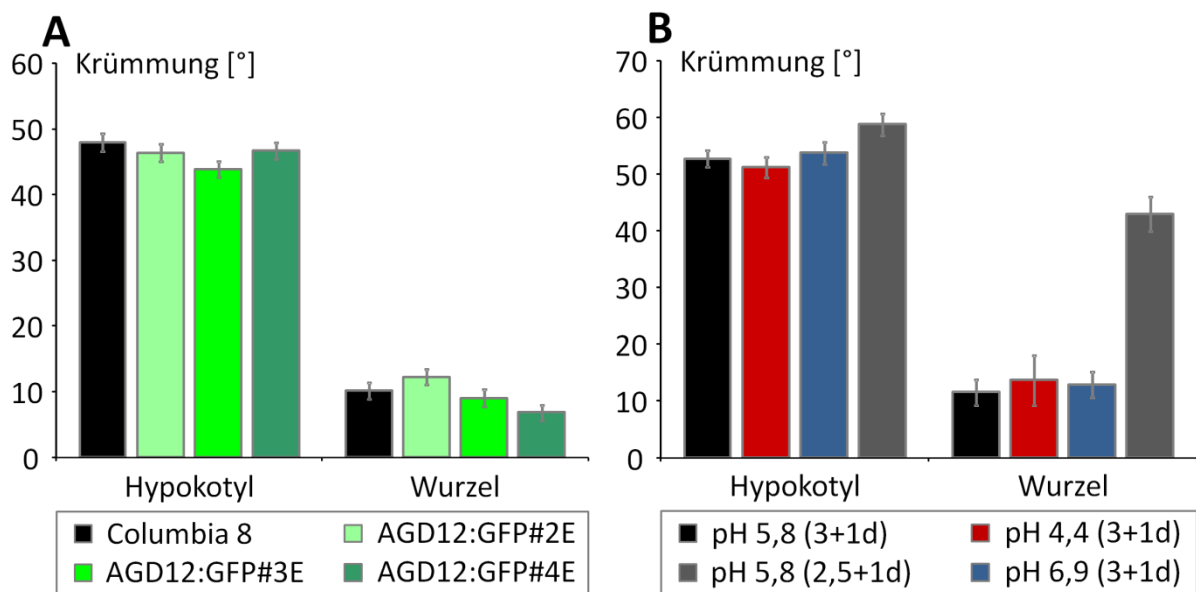


Abbildung 44: Versuchsoptimierung zum Gravitropismus von AGD12:GFP-Überexpressionslinien

(A) Hypokotyl-Krümmung 4 Tage alter Keimlinge von Wildtyp Columbia 8 und drei homozygoten (T3) AGD12:GFP-Überexpressionslinien nach 24 stündiger Inklination von 90°. (B) Hypokotyl-Krümmung von Keimlingen des Wildtyps Columbia 8, gewachsen auf ½ MS-Phytigel mit unterschiedlichen pH-Werten sowie verkürzter Anzuchtzeit von 3 auf 2,5 Tage vor einer 24 Stunden Inklination um 90°. Resultierende Mittelwerte wurden mittels Imagetool bestimmt und der Standardfehler ermittelt.

Abbildung 44 zeigt eine Versuchsoptimierung zur Untersuchung des Gravitropismus bei AGD12:GFP-Überexpressionslinien in Abhängigkeit von pH-Wert und der Anzuchtzeit. Dabei zeigte sich, dass der Hypokotyl-Gravitropismus bei allen untersuchten Keimlingen deutlich stärker ausfiel als bei der Wur-

zel. So wiesen der Wildtyp Columbia 8 sowie die transgenen T3-Keimlinge AGD12:GFP2E, 3E und 4E eine Hypokotyl-Krümmung zwischen 40° und 50° auf (Abb. 44A). Die Wurzeln aller Keimlingspopulationen zeigten zeitgleich jedoch nur Krümmungen im Bereich von 10°. Signifikante Unterschiede waren somit nicht erkennbar.

Die aus der Versuchsoptimierung resultierenden Werte zeigten ebenso eine stärkere gravitrope Reaktion der Hypokotyle (Abb. 44B). Zudem wurde deutlich, dass sowohl eine Erhöhung als auch eine Verringerung des pH-Werts des ½ MS-Phytagels keine signifikanten Auswirkungen auf den Gravitropismus von Columbia 8 hatten. Einzig eine Verkürzung der Anzuchtzeit von 3 Tagen auf 2,5 Tagen vor eintägiger Inklinatation zeigte einen Effekt: So wiesen Hypokotyle mit verkürzter Anzuchtzeit eine leicht gesteigerte Krümmung auf. Noch stärker fiel der Unterschied beim Wurzelgravitropismus aus. So vervierfachte sich die Wurzel-Krümmung bei verkürzter Anzuchtzeit auf über 40°.

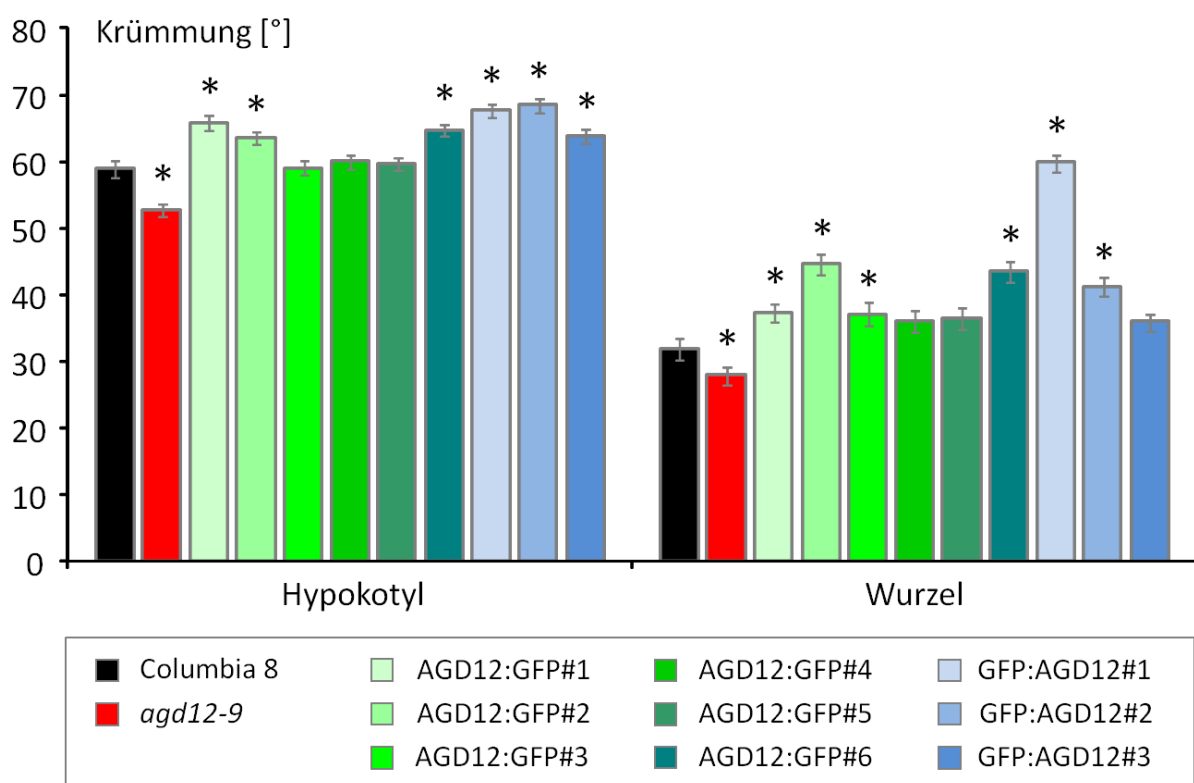


Abbildung 45: Gravitropismus bei Keimlingen diverser AGD12-Überexpressionslinien

Gravitropismus bei Hypokotyl und Wurzel 3,5 Tage alter Keimlinge des Wildtyps Columbia 8, der Mutante *agd12-9* und diverser AGD12-Überexpressionslinien, welche unter der Kontrolle eines 35S-Promotors die Genkonstrukte AGD12:GFP (T2, grüne Balken) bzw. GFP:AGD12 (T2, blaue Balken) exprimieren. Die Mittelwerte der Krümmung nach 24 Stunden Inklinatation um 90° von je 127 bis 167 Keimlingen wurden mittels Imagetool bestimmt und mit ermittelten Standardfehlern abgebildet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Wildtyp Columbia 8 und transgenen Linien wurden mittels ANOVA bestimmt und mit einem Stern markiert. Publiziert in Dümmer et al., 2016 (Figure 3).

Abbildung 45 stellt den Gravitropismus von Keimlingen mit AGD12:GFP- und GFP:AGD12-Überexpression im Vergleich zum Wildtyp Columbia 8 und der Mutante *agd12-9* dar. Dabei zeigte sich, dass *agd12-9* einen signifikant geringeren Hypokotyl- und Wurzelgravitropismus als Columbia 8 aufweist. Einige Keimlinge der AGD12:GFP-Überexpressionslinien zeigten ein hypergravitropes Verhalten, wobei die Hälfte dieser Überexpressionslinien einen mit Columbia 8 vergleichbaren

Gravitropismus aufwies. Noch drastischere Unterschiede zum Wildtyp zeigten die Keimlinge der untersuchten GFP:AGD12-Überexpressionslinien. Bei ihnen wies nahezu jede Überexpressionslinie einen signifikant erhöhten Hypokotyl- und Wurzelgravitropismus auf. Schlussendlich führte die Reduktion der Anzuchtzeit zu allgemein höherer Wurzelkrümmung und somit zu einer besseren Differenzierung zwischen Wildtyp und AGD12-Überexpressionslinien. Dadurch wurde deutlich, dass sowohl AGD12:GFP- als auch GFP:AGD12-Überexpressionslinien einen mehrheitlich verstärkten Hypokotyl- und Wurzelgravitropismus aufweisen.

4. 5. 6. Untersuchungen zum Phototropismus von AGD12-Überexpressionslinien

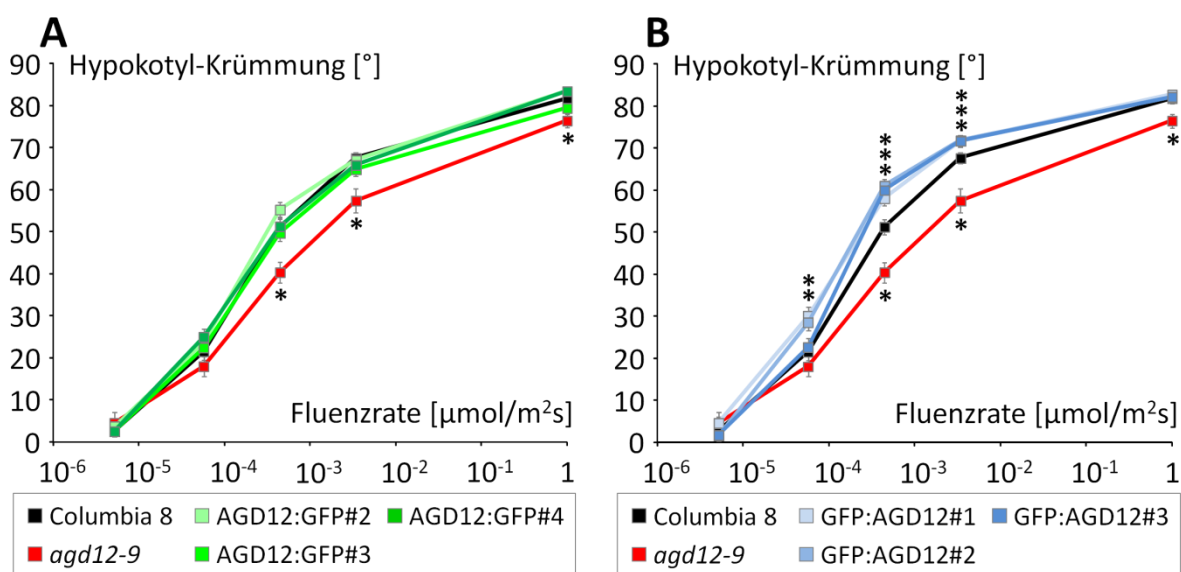


Abbildung 46: Phototropismus bei Keimlingen diverser AGD12-Überexpressionslinien

Hypokotyl-Phototropismus 4 Tage alter Keimlinge des Wildtyps Columbia 8, der Mutante *agd12-9* und je drei (A) AGD12:GFP- bzw. (B) GFP:AGD12-Überexpressionslinien. Die Expression der GFP-Fusionskonstrukte erfolgte konstitutiv unter der Kontrolle eines 35S CaMV-Promotors. Die Mittelwerte der Hypokotyl-Krümmung von 57 bis 80 Keimlingen wurden nach 24 Stunden seitlicher Belichtung durch Blaulicht mit $\lambda_{\max} = 465$ nm mittels Imagetool bestimmt und deren Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Wildtyp Columbia 8 und den transgenen Linien wurden mittels ANOVA bestimmt und mit einem Stern markiert. Publiziert in Michalski et al., 2017 (Figure 5).

Abbildung 46 zeigt den Phototropismus von AGD12:GFP- und GFP:AGD12-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp Columbia 8 und der Mutante *agd12-9*. Dabei wurde deutlich, dass die Mutante *agd12-9* mit Ausnahme des Schwellenwerts eine stets geringere Hypokotyl-Krümmung als der Wildtyp Columbia 8 aufwies. Im Fall der drei untersuchten AGD12:GFP-Überexpressionslinien zeigte sich im Vergleich mit Columbia 8 keine veränderte phototrope Reaktion (Abb. 46A). Dem entgegen wiesen Keimlinge der GFP:AGD12-Überexpressionslinien eine teilweise hyperphototrope Reaktion auf (Abb. 46B). Dabei reagierten die Keimlinge nicht auf Fluenzraten unter 10^{-5} $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Mit zunehmenden Fluenzraten krümmten sich Keimlinge mit GFP:AGD12-Überexpression signifikant stärker als Columbia 8. Abschließend näherten sich alle Linien bei Fluenzraten um 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ an den maximalen Krümmungswert von 90° an. Somit wiesen Hypokotyle von GFP:AGD12-Überexpressionslinien, im Gegensatz zu AGD12:GFP-Keimlingen, ein hyperphototropes Verhalten auf.

4. 5. 7. Vergleich der Proteinsequenzen von AGD11, AGD12 und AGD13

	1	50
AGD11	MSLGQENVDPVEVSGSHACLYELLCSETPKWTPLRVEDLQTSSTDPDRRL	
AGD12	-----MSYSGAGLGKPGSGKR--RT	
AGD13	-----MSNYAAGLGKPGSGKR--RI	
	51	100
AGD11	EXLLKQPCNRYCADCGSPPEKVVSLSLGVFICIKCSGVHRSLGVIHISKVL	
AGD12	RDLLTQSDNRVCADCGAPDPKWSANIGVFICLKCCGVHRSLGSHISKVL	
AGD13	RDLLNQSDNRVCADCGASDPKWSANIGVFICLKCCGVHRSLGTHISKVL	
	101	150
AGD11	SVKLDIEWIDDOVDMLVGYGGMTAVNERFEACNIDQSKPKPDSTNEERND	
AGD12	SVTLDEWSDEEVDSMIEIGGNASANSIYEAFIPEGSSKPGPDASHDQRMRL	
AGD13	SVTLDEWSDEEVDSMIEIGGNASANSIYEAFIPDTCSKPGPDVNHQRMRL	
	151	200
AGD11	FIRSKYEQHCFMDPAGALCTYQQPSRTINTSPPSLCSASHRSTKNRIGHA	
AGD12	FIRSKYEHQEFLLKPSLRITSVRG----SSTKTPAFLSS---SLSKKIVDS	
AGD13	FIRAKYELQEFLLKPSLRITSGKG----STKSSAFLTS---SLSKKIMDS	
	201	250
AGD11	FRNSWGRRES DHKGP KKSNSMAGMVEFVGLIKVNVVKGTNLAVRDVMISD	
AGD12	FRTNSSSQQ-----PQ-----LEGMVEFI GLLKVTIKKGTNMAIRDMMSSD	
AGD13	FRTNSSSQT-----MFQEGMVEFI GLLKVTIKKGTNLAIRDMMSSD	
	251	300
AGD11	PYVILALGQQSVKTRVIKNNLNPNVWNETLMLSIPPEMPPIKVLVYDKDTF	
AGD12	PYVVLTLGQQKAQSTVVKSNLNPNVWNEELMLSVPHNYGSVKLQVFDYDTF	
AGD13	PYVVLNLGKQKLQTTVMNSNLNPNVWNEELMLSVPESYGPVKLQVYDYDTF	
	301	350
AGD11	STDDFMGEAEIDIQPLVSAAKAYETSSIKEPMQLGSWVASKENTLVSDGI	
AGD12	SADDIMGEAEIDIQPLITSAMAFGDPFMFGDMQIGKWLKSHDNALIEDSI	
AGD13	SADDIMGEAEIDIQPLITSAMAFGDPFMFGDMQIGKWLKSHDNPLIDDSI	
	351	385
AGD11	ILLIEDGKVKQDISLRLQNVERGVLEIQLECLPLITQ	
AGD12	INIADGKVKQEVQIKLQNVESGELELEMEWLPLEQ	
AGD13	INIVDGKVKQEVQIKLQNVESGELELEMEWLPIDQ	

Abbildung 47: Vergleich der Proteinsequenz von AGD12 mit AGD11 und AGD13

Vergleich der Aminosäuresequenzen von AGD11 (AT3G07940.1), AGD12 (AT4G21160.1) und AGD13 (AT4G05330.1). Mit Vermerk auf zu AGD12 (A) identischen oder (A) ähnlichen Aminosäuren, (A) Arf-GAP-Domänen, (A) C2/CaLB-Domänen sowie (*) putativen Ca^{2+} -Liganden. Sequenzanalyse und Darstellung mittels Vector NTI, ClustalX und NCBI Protein BLAST.

Der in Abbildung 47 dargestellte Vergleich der Proteinsequenzen von AGD11, AGD12 und AGD13 zeigte, dass alle drei Proteine über eine Arf-GAP- und C2/CaLB-Domäne verfügen. Die darin enthaltenen Bindestellen für Ca^{2+} waren bei allen drei C2/CaLB-Domänen konserviert. Ebenso lagen bei den drei Proteinen Arf-GAP-Domänen Liganden zur Bindung von Ca^{2+} vor, wobei diese im Fall von AGD11 nicht vollständig konserviert waren. Zudem zeichnete sich AGD11 durch einen verlängerten N-Terminus und verlängerten Linker zwischen Arf-GAP- und C2/CaLB-Domäne aus. Zusammenfassend zeigte AGD11 43,6 % Übereinstimmung und AGD13 86,9 % Übereinstimmung mit AGD12.

4. 5. 8. Überexpression von AGD11 und AGD13 in *N. benthamiana*

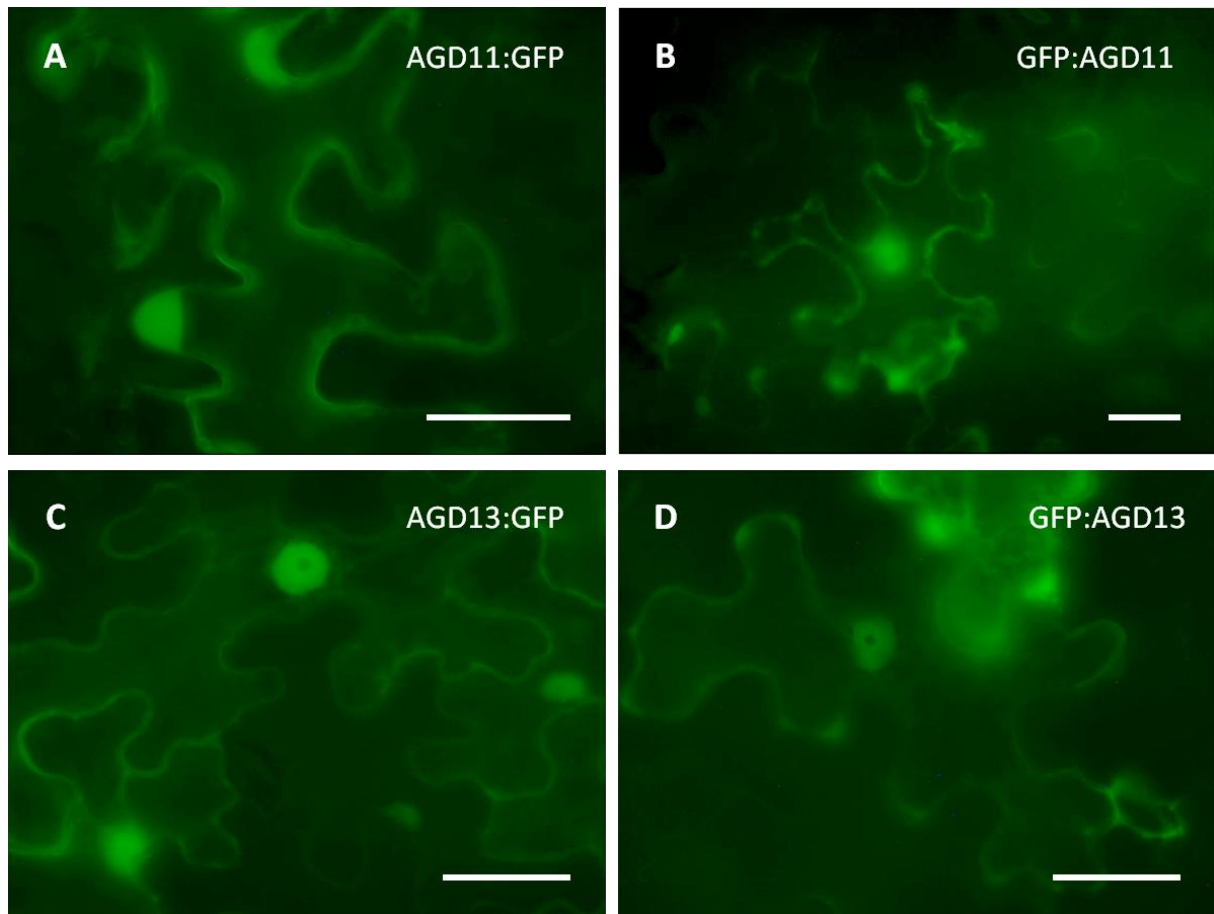


Abbildung 48: Expression von AGD11- und AGD13:GFP-Fusionsproteinen in Tabak-Epidermiszellen

GFP-Fluoreszenz in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* nach 3 bis 5 Tagen Expression von (A) AGD11:GFP, (B) GFP:AGD11, (C) AGD13:GFP, (D) GFP:AGD13 nach transienter Transformation. Dokumentiert mittels Epifluoreszenzmikroskop. Größenstandard entspricht 30 µm (weißer Balken).

Abbildung 48 zeigt die GFP-Fluoreszenz in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* als Folge einer transienten Transformation durch Expressionsvektoren für AGD11:GFP- (Abb. 48A und B) bzw. AGD13:GFP-Fusionsproteine (Abb. 48C und D). Dabei war nach allen Transformationen ein GFP-Signal im Bereich von Zellkern, Cytoplasma und Zellmembran zu beobachten.

4. 5. 9. Untersuchungen zu Tropismen von AGD11-Überexpressionslinien

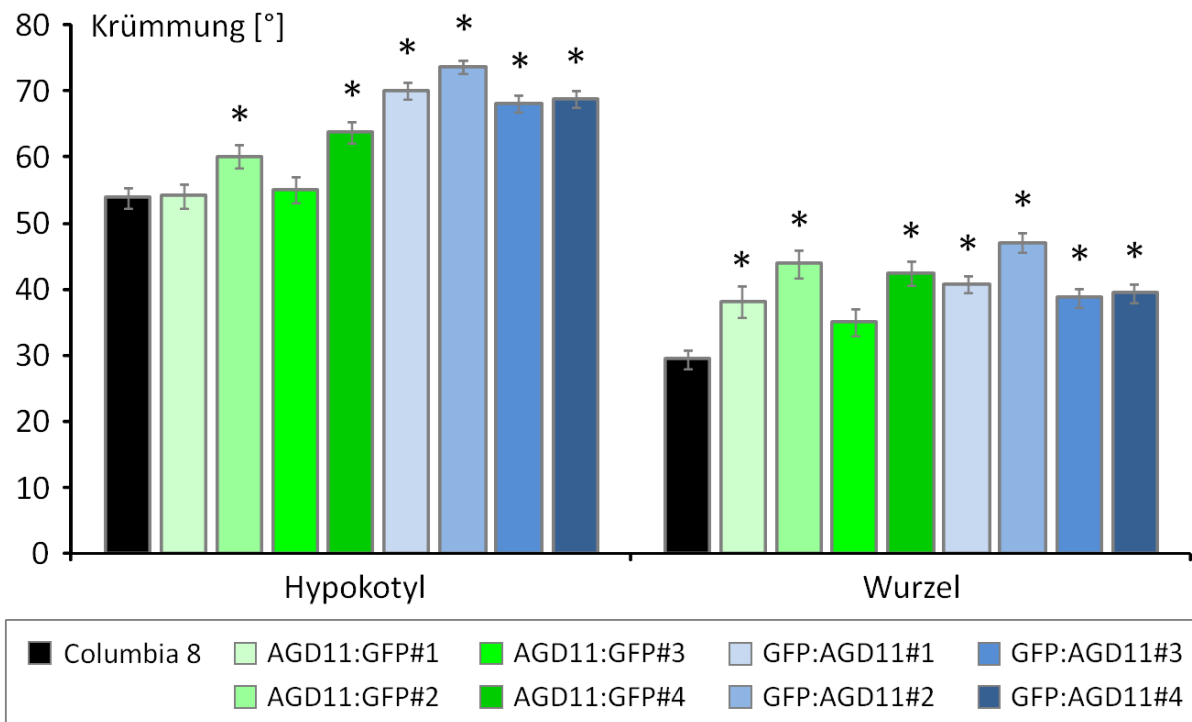


Abbildung 49: Gravotropismus bei Keimlingen diverser AGD11-Überexpressionslinien

Gravotropismus bei Hypokotyl und Wurzel 3,5 Tage alter Keimlinge des Wildtyps Columbia 8 und diverser AGD11-Überexpressionslinien. Die Expression der GFP-Fusionskonstrukte AGD11:GFP bzw. GFP:AGD11 erfolgte konstitutiv unter der Kontrolle eines 35S CaMV-Promotors. Abgebildet sind Mittelwerte der Hypokotyl- und Wurzelkrümmung nach 24 Stunden Inklination um 90° von je 120 bis 137 Keimlingen. Die Winkel wurden mittels Imagetool bestimmt und der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Wildtyp Columbia 8 und transgenen Linien wurden mittels ANOVA bestimmt und mit einem Stern markiert.

Abbildung 49 stellt den Gravotropismus von Keimlingen mit AGD11:GFP- und GFP:AGD11-Überexpression verglichen mit dem Wildtyp Columbia 8 dar. Dabei zeigte die Hälfte der AGD11:GFP-Überexpressionslinien ein hypergravitropes Verhalten bei Hypokotyl und Wurzel. Zudem wiesen alle GFP:AGD11-Überexpressionslinien einen gesteigerten Hypokotyl- und Wurzelgravotropismus auf.

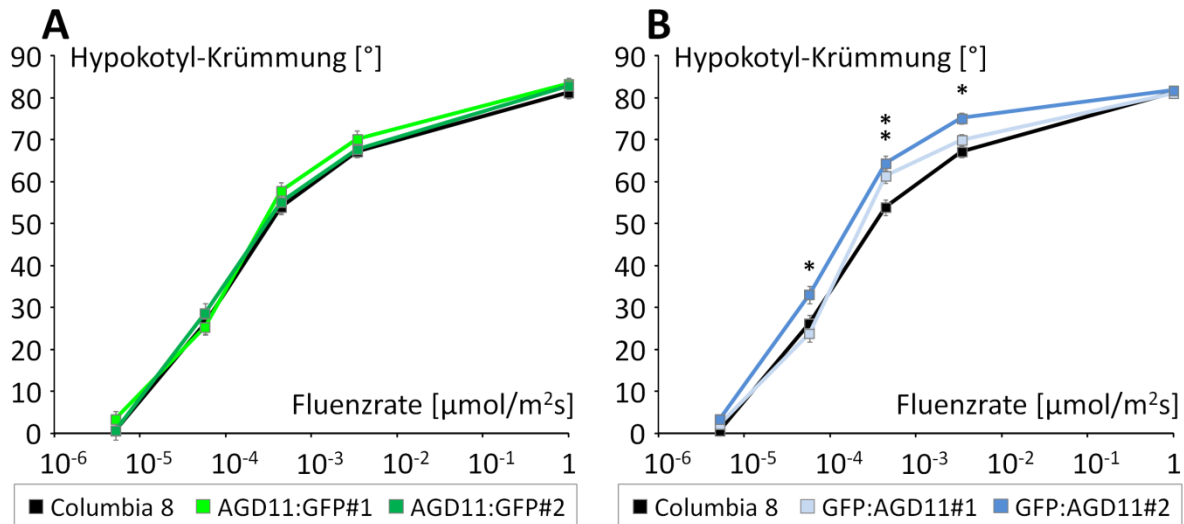


Abbildung 50: Phototropismus bei Keimlingen diverser AGD11-Überexpressionslinien

Hypokotyl-Phototropismus 4 Tage alter Keimlinge des Wildtyps Columbia 8 und (A) AGD11:GFP- bzw. (B) GFP:AGD11-Überexpressionslinien. Die Expression der GFP-Fusionskonstrukte erfolgte konstitutiv unter der Kontrolle eines 35S CaMV-Promotors. Die Mittelwerte der Hypokotyl-Krümmung von 38 bis 53 Keimlingen wurden nach 24 Stunden seitlicher Belichtung durch Blaulicht mit $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$ mittels Imagetool bestimmt und der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Wildtyp Columbia 8 und transgenen Linien wurden mittels ANOVA bestimmt und mit einem Stern markiert.

Abbildung 50 zeigt den Phototropismus von AGD11:GFP- und GFP:AGD11-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp Columbia 8. Dabei zeigte sich bei AGD11:GFP-Überexpressionslinien keine veränderte phototrope Reaktion (Abb. 50A). Jedoch wiesen Keimlinge der GFP:AGD11-Überexpressionslinien eine teilweise hyperphototrope Reaktion auf (Abb. 50B). Dabei reagierten die Keimlinge nicht auf Fluenzraten unter $10^{-5} \mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Oberhalb dieses Schwellenwerts krümmten sich Keimlinge mit GFP:AGD11-Überexpression bei höheren Fluenzraten jedoch signifikant stärker als Columbia 8. Abschließend näherten sich alle Keimlinge bei einer Fluenzrate von $1 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ einander wieder an.

Zusammengefasst wiesen Keimlinge mit Expression von AGD11:GFP und GFP:AGD11 einen gesteigerten Hypokotyl- und Wurzelgravitropismus auf. Untersuchungen zum Hypokotyl-Phototropismus zeigten dagegen nur im Fall von GFP:AGD11-Überexpressionslinien hyperphototrope Reaktionen.

4. 5. 10. Untersuchungen zu Tropismen von AGD13-Überexpressionslinien

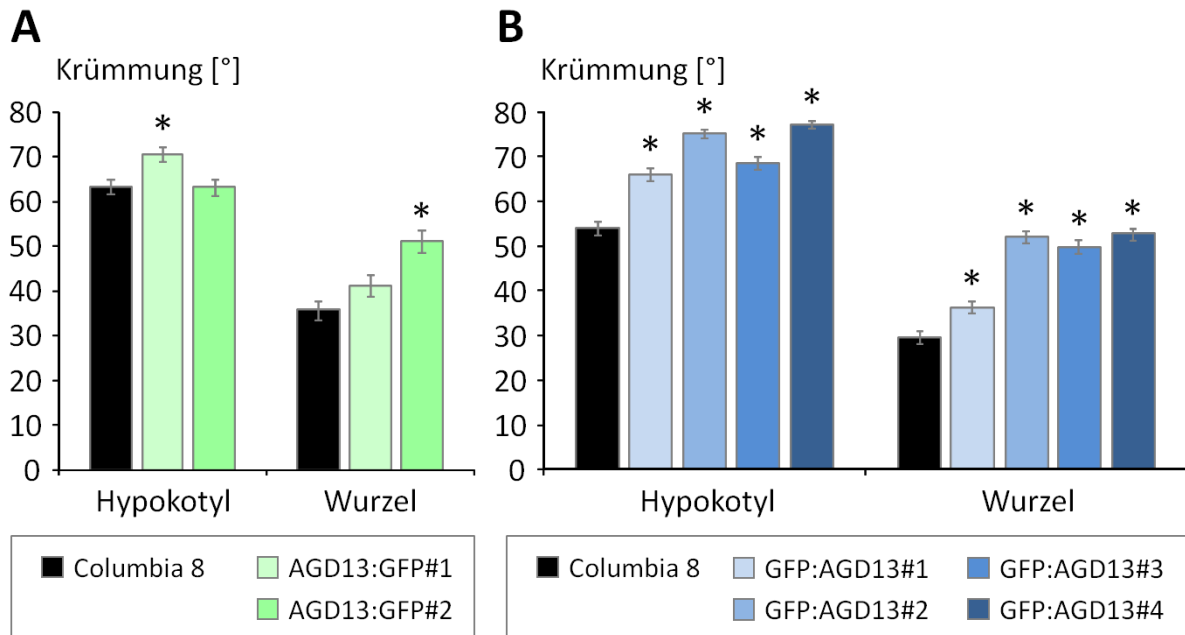


Abbildung 51: Gravitropismus bei Keimlingen diverser AGD13-Überexpressionslinien

Gravitropismus von Hypokotyl und Wurzel 3,5 Tage alter Keimlinge des Wildtyps Columbia 8 und diverser AGD13-Überexpressionslinien. Die Expression der GFP-Fusionskonstrukte AGD11:GFP bzw. GFP:AGD11 erfolgte konstitutiv unter der Kontrolle eines 35S CaMV-Promotors. Die Mittelwerte der Krümmung nach 24 Stunden Inklination um 90° von je 69 bis 147 Keimlingen wurden mittels Imagetool bestimmt und der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Wildtyp Columbia 8 und transgenen Linien wurden mittels ANOVA bestimmt und mit einem Stern markiert.

Abbildung 51 stellt den Gravitropismus von Keimlingen mit AGD13:GFP- und GFP:AGD13-Überexpression verglichen mit dem Wildtyp Columbia 8 dar. Dabei zeigten Keimlinge mit AGD13:GFP-Überexpression eine mehrheitlich hypergravitrope Reaktion sowohl im Hypokotyl als auch in der Wurzel (Abb. 51A). Zudem wiesen alle GFP:AGD13-Überexpressionslinien einen verstärkten Hypokotyl- und Wurzelgravitropismus auf (Abb. 51B).

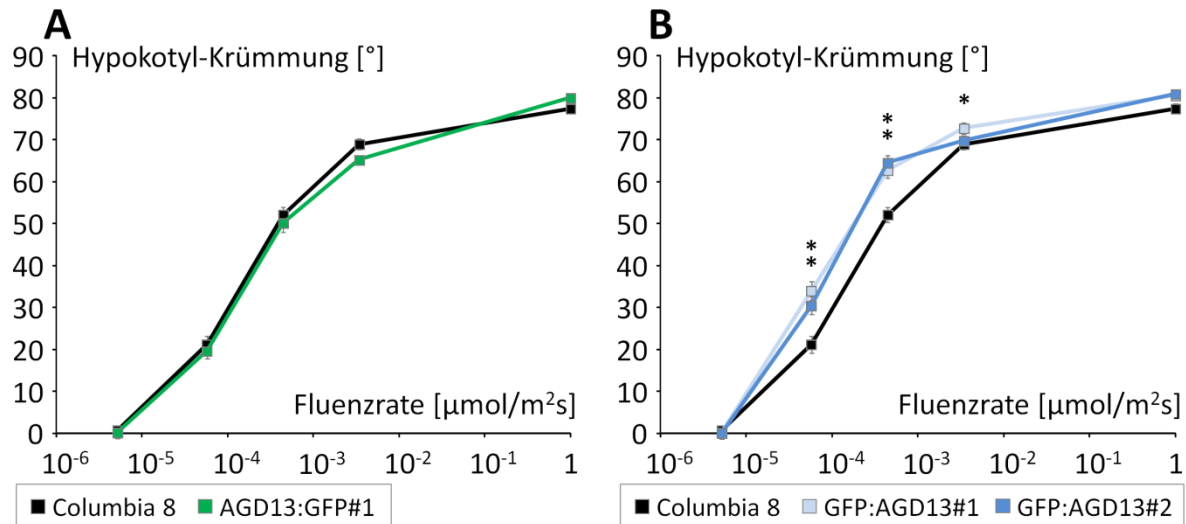


Abbildung 52: Phototropismus bei Keimlingen diverser AGD13-Überexpressionslinien

Hypokotyl-Phototropismus 4 Tage alter Keimlinge des Wildtyps Columbia 8 und (A) AGD13:GFP- bzw. (B) GFP:AGD13-Überexpressionslinien. Die Expression der GFP-Fusionskonstrukte erfolgte konstitutiv unter der Kontrolle eines 35S CaMV-Promotors. Die Mittelwerte der Hypokotyl-Krümmung von 25 bis 54 Keimlingen wurden nach 24 Stunden seitlicher Belichtung durch Blaulicht mit $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$ mittels Imagetool bestimmt und der Standardfehler berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Wildtyp Columbia 8 und transgenen Linien wurden mittels ANOVA bestimmt und mit einem Stern markiert.

Abbildung 52 stellt den Phototropismus von AGD13:GFP- und GFP:AGD13-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp Columbia 8 dar. Dabei zeigte sich bei Keimlingen mit AGD13:GFP-Überexpression keine veränderte phototrope Reaktion (Abb. 52A). Dem entgegen wiesen Keimlinge der GFP:AGD13-Überexpressionslinien eine teilweise hyperphototrope Reaktion auf (Abb. 52B), wobei keiner der Keimlinge auf Fluenzraten unter $10^{-5} \text{ µmol/m}^2\text{s}$ reagierte. Mit zunehmenden Fluenzraten krümmten sich Keimlinge mit GFP:AGD13-Überexpression jedoch signifikant stärker als Columbia 8. Bei Fluenzraten um $1 \text{ µmol/m}^2\text{s}$ näherten sich die phototropen Reaktionen aller Linien jedoch wieder einander an. Schlussendlich wiesen AGD13:GFP- und GFP:AGD13-Überexpressionslinien eine mehrheitlich hypergravitrope Reaktion bei Hypokotyl und Wurzel auf. Untersuchungen zum Hypokotyl-Phototropismus zeigten nur bei Linien mit Expression von GFP:AGD13 eine hyperphototrope Reaktion.

5. Diskussion

Der im Verlauf dieser Arbeit untersuchte Phototropismus, wie auch Gravitropismus, lässt sich grob in drei Phasen unterteilen (Swarup und Bennett, 2009). Ausgangspunkt ist die Wahrnehmung eines Licht- bzw. Schwerkraftreizes durch Rezeptoren sowie eine Signalumwandlung. Daran schließt eine Signaltransduktion an, welche letztlich in einer phototropen bzw. gravitropen Reaktion mündet. Im Fall des Blaulicht-induzierten Phototropismus höherer Pflanzen dienen phot1 und phot2 der Reizwahrnehmung und Reizumwandlung (Christie et al., 1998; Sakai et al., 2001). Das an beide Blaulichtrezeptoren gebundene Protein NPH3 ist dabei essentiell für die anschließende Signaltransduktion des Phototropismus (Motchoulski und Liscum, 1999).

Dem entgegen ist der pflanzliche Rezeptor für die Wahrnehmung von Schwerkraftreizen gegenwärtig noch nicht eindeutig definiert. Jedoch spielen Statolithen in der Stärkescheide des Hypokotyls sowie in der Columella der Wurzelspitze eine wesentliche Rolle bei der Perzeption von Schwerkraft (Haberlandt, 1900; Němec, 1900). So zeigen Stärkemutanten ohne Statolithen nahezu keine gravitrope Reaktion (Kiss et al., 1989; Sæther und Iversen, 1991). Folglich ist die Grundvoraussetzung der Schwerkraftperzeption die Sedimentation dieser stärkereichen Amyloplasten entlang des Schwerkraftvektors (Abb. 1A). Dies wiederum ermöglicht den jeweiligen Statocyten in der Stärkescheide und Columella die Wahrnehmung durch einen bislang unbekannten Rezeptor (Blancaflor et al., 1998). Dabei gibt es Indizien, dass es sich bei diesem Schwerkraftrezeptor um ein durch Statolithen-Sedimentation aktivierten mechanosensitiven Ionenkanal handelt (Baldwin et al., 2013; Sato et al., 2015). So kommt es im Zuge eines Schwerkraftstimulus zu einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sowie des apoplastischen pH-Werts (Gehring et al., 1990; Plieth und Trewavas, 2002; Sievers et al., 1984). Eine Reaktion, die auch nach Belichtung mit Blaulicht, abhängig von Phototropin, erfolgt (Gehring et al., 1990; Stoelze et al., 2003). Demnach spielen Ca^{2+} sowie der veränderte apoplastische pH eine wichtige Rolle bei der frühen Signaltransduktion von Gravi- und Phototropismus. Weitere Elemente der frühen gravitropen und phototropen Signaltransduktionskette wurden hingegen noch nicht beschrieben.

Der zyklische GTP/GDP-Austausch an ARFs stellt ein weiteres Element der photo- und gravitropen Signaltransduktion dar (Ding et al., 2011; Geldner et al., 2001). Hierbei liegen als ARFs bezeichnete GTPasen in einer GDP-gebundenen Form im Cytosol vor (Franco et al., 1995). Im Fall eines GDP/GTP-Austauschs durch einen geeigneten GTP-Austauschfaktor (GEF) wie GNOM kommt es zur Bindung von ARF an eine Endomembran und anschließenden zur Bildung eines Transportvesikels (Antonny et al., 1997; Kirchhausen, 2000). Eine Reaktion, die durch die Aktivierung der GTPasen durch GAPs und anschließender GTP-Hydrolyse umgekehrt werden kann und zur Ablösung der ARFs sowie des Transportvesikels von der Endomembran führt (Abb. 4). Eine Unterbrechung dieses zyklischen GDP/GTP-Austauschs, beispielsweise durch BFA, hat eine gestörte photo- und gravitrope Reaktion zur Folge (Ding et al., 2011; Geldner et al., 2003). So ist die Verteilung der Auxin-Carrier AUX1 sowie der PIN-Proteine über Transportvesikel dieses Trans-Golgi-Netzwerks essentiell für den Photo- und Gravitropismus (Ding et al., 2011; Geldner et al., 2001). Deren Bedeutung zeigt sich anhand der reduzierten phototropen und gravitropen Reaktionen bei *pin2* (Müller et al., 1998; Wan et al., 2012), *pin3* (Ding et al., 2011; Friml et al., 2002) und *aux1* Mutanten (Bennett et al., 1996; Stone et al., 2008). Dabei bestimmt die Verteilung dieser Auxin-Carrier die Verteilung von Auxin (Abb. 5). Folglich führt eine

laterale Belichtung zuerst zu einer Umverteilung der Auxin-Carrier, welche dann eine Auxin-Umverteilung zur Licht-abgewandten Seite der Pflanze zur Folge hat (Friml et al., 2002). Analog dazu kommt es, als Folge einer Inklinatation, zu einer Auxin-Umverteilung zur unteren Seite der Pflanze (Friml et al., 2002; Hou et al., 2004). Das Resultat ist eine asymmetrische Zellstreckung und damit eine Krümmung der betreffenden Organe gemäß der Cholodny-Went-Hypothese (Cholodny, 1924; Went, 1926). Somit folgt auf die Perzeption von Licht bzw. Schwerkraft und einer Signaltransduktion, an der Ca^{2+} , ARFs, Auxin-Carrier und Auxin beteiligt sind, die eigentliche photo- bzw. gravitrope Reaktion (Swarup und Bennett, 2009). Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, einen kausalen Zusammenhang zwischen der Rolle von NPH3 nach Belichtung und Ca^{2+} -Freisetzung nach gravitroper Stimulation mit der ARF-induzierten Umverteilung der PIN-Proteine herzustellen. Ziel dieser Arbeit ist daher die Beantwortung offener Fragen bezüglich weiterer Elemente der frühen photo- und gravitropen Signaltransduktion.

5. 1. AGD12 und EHB1 beeinflussen Photo- und Gravitropismus

Die Entdeckung von EHB1 als Interaktionspartner von NPH3 bot dabei einen guten Ansatz diese Informationslücke hinsichtlich phototroper Signaltransduktion zu schließen (Knauer et al., 2011). Jedoch zeigte eine entsprechende *loss-of-function*-Mutante (*ehb1-2*) eine hyperphototrope Hypokotyl-Krümmung (Knauer et al., 2011; Michalski et al., 2017). Demnach ist EHB1 kein direktes Glied der Signalkette, sondern ist vielmehr als negativer Effektor des Phototropismus zu sehen (Abb. 55). Der Umstand, dass die *ehb1-2*-Mutante zudem einen verstärkten Hypokotyl- und Wurzelgravitropismus aufzeigt (Dümmer et al., 2016; Knauer et al., 2011) verdeutlicht, dass EHB1 auch als negativer Effektor des Gravitropismus fungiert (Abb. 54). Demnach ist davon auszugehen, dass EHB1 an einer Stelle des Signaltransduktion positioniert ist, an der sich die Signalwege von Photo- und Gravitropismus vereinigen oder bereits vereint sind (Abb. 56). Jedoch wurden auch, abhängig von den gewählten Versuchsbedingungen, Abweichungen von diesem Phänotyp beobachtet, wie beispielsweise hypophototrope (Abb. 37 & Abb. 38) bzw. hypogravitrope (Abb. 33B und Abb. 34B) Reaktionen des Hypokotyls. Der Umstand, dass bereits frühere Studien einen wechselhaften Hypokotyl-Phänotyp aufzeigen (Dümmer et al., 2015a) lässt vermuten, dass EHB1 vielleicht eine geringe oder eine von den Umgebungsparametern abhängige Funktion im Photo- und Gravitropismus des Hypokotyls hat. Deutlicher war der Einfluss von EHB1 als negativer Effektor beim Wurzelgravitropismus (Abb. 2, Abb. 35 & Abb. 36), was zudem durch das hypophototrope Verhalten der *ehb1-2*-Mutante beim Wurzelphototropismus unterstützt wurde (Abb. 23B). So ist es sehr wahrscheinlich, dass EHB1 vergleichsweise geringen Einfluss auf den Wurzelphototropismus hatte, der gesteigerte Wurzelgravitropismus von *ehb1-2* jedoch dem Wurzelphototropismus verstärkt entgegen wirkte. In Einklang mit dieser These führte die Minimierung des Schwerkraftreizes durch Clinostatisierung zu einer hyperphototropen Wurzel bei *ehb1-2* (Abb. 24B & Abb. 55). Allerdings verringert der Umstand, dass eine verkürzte Anzuchtzeit dazu führte, dass Keimlinge durch die Clinostatisierung bzw. geringe Zentrifugalkräfte beeinflusst wurden, die Aussagekraft dieser Resultate. Der genaue Einfluss von EHB1 auf den Wurzelphototropismus kann daher noch nicht vollständig bestimmt werden.

Nach der Entdeckung von EHB1 wurde anhand von Sequenz-Übereinstimmungen nach verwandten Proteinen gesucht. Ein Resultat dieser Suche war das Protein AGD12, welches wie EHB1 über eine C2/CaLB-Domäne verfügt, sowie eine zusätzliche Arf-GAP-Domäne besitzt (Abb. 3B). Proteininterak-

tionsstudien mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System zeigten zudem, dass AGD12 wie EHB1 an NPH3 bindet (Abb. 3A). Um festzustellen, ob AGD12 ähnlich wie EHB1 Einfluss auf Photo- und Gravitropismus hat, wurden entsprechende T-DNA-Insertionslinien untersucht und eine geeignete *loss-of-function*-Mutante (*agd12-9*) ausgewählt (Abb. 19). Anders als bei *ehb1-2* führt das Fehlen von AGD12 zu verringertem Hypokotyl-Phototropismus bei normalem und verringertem Schwerkraftreiz (Abb. 21). Dabei geht der hypophototrope Phänotyp von *agd12-9* nicht auf ein verändertes Längenwachstum der Mutante zurück (Abb. 20) und wird bereits zu Beginn der phototropen Reaktion deutlich (Abb. 22). Höhere Fluenzraten führen im Allgemeinen zu längeren Latenzzeiten, die vermutlich bei *agd12-9* verkürzt sind und so zu einem kurzzeitig hyperphototropen Wachstum der Mutante führen (Abb. 22B). Versuche mit Wurzeln zeigen zudem, dass AGD12 neben dem Hypokotyl auch ein positiver Effektor des Wurzelphototropismus ist (Abb. 23A), wobei eine Clinostatisierung den jeweiligen Anteil von Photo- und Gravitropismus auf diese Wurzelkrümmung vorerst nicht aufschlüsseln konnte (Abb. 24A). Eine Verknüpfung zwischen dem hypophototropen Phänotyp von *agd12-9* und der zuvor nachgewiesenen Interaktion zwischen NPH3 und AGD12 ist somit naheliegend. AGD12 kann folglich als positiver Effektor des Phototropismus betrachtet werden (Abb. 55), was zudem durch das hyperphototrope Verhalten von Keimlingen, die AGD12 als GFP:AGD12-Hybridprotein konstitutiv überexprimieren, untermauert werden konnte (Abb. 46A). Auffällig war in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass eine Überexpression von AGD12:GFP keinen Einfluss auf den Phototropismus hatte (Abb. 46B). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die C-terminale C2/CalB-Domäne eventuell notwendig für die Funktionalität von AGD12 ist und wahrscheinlich durch die GFP-Fusion blockiert wurde. Folglich hatten AGD12:GFP-Fusionsproteine keinen Einfluss auf die phototrope Signaltransduktion. Vergleichbare Resultate konnten auch mit AGD11- und AGD13-Überexpressionslinien erzielt werden (Abb. 50 & Abb. 52). Dies bestärkt die Vermutung, dass diese AGD12-homologen Proteine mit ihrer hohen Sequenzübereinstimmung (Abb. 47) gleichermaßen als positive Effektoren des Phototropismus fungieren.

Der verringerte Hypokotyl- und Wurzelgravitropismus der Mutante *agd12-9* deutet darauf hin, dass AGD12 ebenso ein positiver Effektor des Gravitropismus sein könnte (Abb. 25 & Abb. 54). Ein Phänotyp, der sich sehr früh nach unterschiedlich starker Inklination manifestierte (Abb. 28), sich jedoch in Anwesenheit von Saccharose dem Wildtyp wieder anglich (Abb. 25). Dabei kann diese Angleichung der gravitropen Reaktion von Mutante und Wildtyp mehrere Ursachen haben. So wird Saccharose von Pflanzen aufgenommen und zu Stärke synthetisiert, was eine Vergrößerung ihrer Statolithen zur Folge hat (Abb. 27). Dies wiederum führt zu einer verstärkten Wahrnehmung des Schwerkraftreizes und verstärkter gravitroper Reaktion (MacCleery und Kiss, 1999; Song et al., 1988). Folglich könnte die Angleichung von Wildtyp und *agd12-9* durch eine gesteigerte Reizwahrnehmung, gefolgt von maximaler gravitroper Reaktion, verursacht worden sein. Versuche dies mittels Clinostat-Zentrifuge und einer Erhöhung des einwirkenden Schwerkraftreizes auf 3 g nachzustellen, schlugen jedoch fehl (Abb. 26). Demnach kann Saccharose nicht nur über die Vergrößerung der Statolithen wirken. So stellt Saccharose auch eine wichtige Energiequelle dar, welche die Geschwindigkeit der Krümmungsreaktion erhöhen kann. Zudem werden Zucker in vielfältiger Form durch die Pflanze transportiert und dienen dabei auch als Signalmoleküle (van Bel und Hess, 2008; Tognetti et al., 2013). So sind Saccharose und andere Zuckerarten wichtige Signalgeber für die Entwicklung von Pflanzen (Kircher und Schopfer, 2012; Yaseen et al., 2013). Realisiert wird dies über Genexpression mit Hilfe zuckerassoziierter Promotormotive (Gupta und Kaur, 2005; Rook et al., 2006). Diese Motive sind auch im Promotorbereich von EHB1, AGD12 und dessen Homologen AGD11 und AGD13 zu finden (Abb. 18).

Demnach ist denkbar, dass die Anwesenheit von Saccharose die Expression der übrigen Arf-GAPs erhöhte und so ein *agd12-9*-Phänotyp effektiv komplementiert wurde. Der Umstand, dass die Überexpression der AGD12-Homologe AGD11 (Abb. 49) und AGD13 (Abb. 51), ähnlich wie bei AGD12-Überexpressionslinien (Abb. 45), zu verstärktem Gravitropismus führte, würde diese These einer Komplementation unterstützen. Zudem wird dadurch deutlich, dass AGD11 und AGD13 ebenfalls als positive Effektoren des Gravitropismus fungieren. Letztlich ist es durchaus möglich, dass ein Zusammenspiel von Schwerkraftreiz, gesteigerter Energiezufuhr und veränderter Genexpression dazu führte, dass Saccharose die gravitrope Reaktion im Allgemeinen verstärkte und zur Angleichung der gravitropen Reaktion der Mutante *agd12-9* an den Wildtyp Columbia 8 führte.

Die Zugabe von NPA hatte dagegen keine Auswirkungen auf den hypogravitropen Phänotyp von *agd12-9* (Abb. 29). Erst bei höheren NPA-Konzentrationen setzte die gravitrope Reaktion sowohl beim Wildtyp als auch bei *agd12-9* aus und näherte sich dem agravitropen Phänotyp von *arf7arf19* an (Abb. 29C; Okushima et al., 2005). Dabei zeigte sich, dass die gravitrope Reaktion von Wurzel und Hypokotyl einer Pflanze scheinbar von einander entkoppelt sind (Abb. 29A). Ebenso resultierte die Addition von photo- und gravitropen Reizen nicht zu einem veränderten bzw. verstärkten Phänotyp (Abb. 30). Demnach kann, in Einklang mit der verringerten photo- und gravitropen Reaktion von *agd12-9*, davon ausgegangen werden, dass AGD12 als positiver Effektor eines gemeinsamen Abschnitts der Signaltransduktion von Gravi- und Phototropismus fungiert (Abb. 56). Wodurch der Einfluss von AGD12 auf die Tropismen größtenteils als antagonistisch zum Einfluss von EHB1 zu sehen ist.

5. 2. Interaktion, Expression und Lokation von AGD12 und EHB1

Der durch die physiologischen Versuche gezeigte Einfluss von AGD12 und EHB1 auf den Phototropismus deckt sich mit der Feststellung, dass beide Proteine im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit NPH3 interagieren (Abb. 3; Knauer et al., 2011; Michalski et al., 2017). Zudem wurden in der Vergangenheit mit CUL3A und AGB1 weitere Proteine beschrieben, die mit NPH3 interagieren (Kansup et al., 2014; Pedmale und Liscum, 2007; Roberts et al., 2011). Folglich ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl von Proteinen gleichzeitig mit NPH3 interagiert oder diese um die Bindung an NPH3 konkurrieren, was wiederum Auswirkungen auf die weitere phototrope Signaltransduktion hätte. So ist es denkbar, dass AGD12 und EHB1 um die Bindung an NPH3 in Konkurrenz stehen oder je nach NPH3-Phosphorylierungszustand unterschiedlich interagieren, woraus sich die Rolle von AGD12 und EHB1 als positiver bzw. negativer Effektor des Phototropismus ableiten könnte. Demnach könnte AGD12 mit seiner Arf-GAP-Domäne als eigentliches Mitglied der Signaltransduktionskette fungieren und das nicht katalytisch wirksame EHB1 hingegen durch eine Bindung an NPH3 diese Signalweiterleitung unterbinden.

Der Umstand, dass AGD11 und AGD13 ebenfalls positive Effektoren des Phototropismus sind (Abb. 50 & Abb. 52) und über eine sehr hohe Sequenzhomologie zu AGD12 verfügen (Abb. 47), lässt vermuten, dass neben AGD12 diese und weitere AGD-Proteine mit NPH3 interagieren. Ebenso sind neben der Interaktion von EHB1 mit NPH3 auch Interaktionen mit vergleichbaren CAR-Proteinen wie CAR7 und CAR8 denkbar (Rodriguez et al., 2014 S2), so dass einem Pool aus positiven Effektoren bzw. AGD-Proteinen ein Pool negativer Effektoren bzw. CAR-Proteinen entgegen steht. Folglich kommt es

durch das Fehlen von AGD12 bzw. EHB1 bei den Mutanten *agd12-9* bzw. *ehb1-2* zur Verschiebung dieses AGD/EHB1-Verhältnis an NPH3. Dies wiederum verstärkt oder reprimiert je nachdem die weitere phototrope Signalweiterleitung, was anschließend zu den bekannten hyper- bzw. hypophototropen Phänotypen führt (Abb. 21; Knauer et al., 2011).

Die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls durchgeführten Proteininteraktionsstudien von AGD12 und EHB1 zu ARFs mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System lassen ein vergleichbares Funktionskonzept von AGD12 und EHB1 vermuten. Die bereits bekannte Fähigkeit von AGD12, die Hydrolyse von GTP durch ARFA1C zu initiieren (Jensen et al., 2000) war ein erster Anhaltspunkt für eine Interaktion zwischen AGD12 und ARFs in *Arabidopsis thaliana*. Diese These konnte sowohl bei Versuchen auf Selektionsplatten (Tabelle 19 & Tabelle 20) als auch mittels α -Galaktosidase-Assay (Abb. 14) untermauert werden. Parallele Untersuchungen mit EHB1 deuteten zudem ebenfalls auf eine Interaktion mit diversen ARFs hin. Die starke Autoaktivität von AGD12 und EHB1 machte hierbei eine zweite Nachweismethode erforderlich. So diente die Quantifizierung mittels α -Galaktosidase-Assay der Bestimmung von Interaktionen die weit über der AGD12- und EHB1-Autoaktivität lagen.

Folglich kommen für AGD12 die Proteine ARFB1B, ARLA1D und SARA1A als potentielle Interaktionspartner in Betracht (Abb. 14). Demnach könnte AGD12 eine Funktion bei der ARF-abhängigen Bildung von COPI-Vesikeln für den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER spielen (Cosson und Letourneur, 1997; Gaynor und Emr, 1997). Wobei vor allem die Interaktion mit ARFB1B besonders interessant ist, da bereits Interaktionen zwischen ARFB1B und phot1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System nachgewiesen wurden, welche durch Blaublicht unterbunden werden (Sullivan et al., 2009). Ein Effekt, der mit einer lichtabhängigen Konformationsänderung von phot1 begründet werden könnte (Harper et al., 2003). Zudem könnte dies ein Resultat der lichtabhängigen Polyubiquitinierung und Proteolyse von phot1 sein (Roberts et al., 2011), sofern Orthologe der beteiligten pflanzlichen Proteine in Hefe existieren. Die Interaktion von AGD12 mit SARA1A zeigt zudem, dass ein Einfluss von AGD12 auch auf die Sar1p-abhängige Bildung von COPII-Vesikeln für den anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat möglich ist (Barlowe et al., 1994). Demnach ist es denkbar, dass AGD12 als ein verknüpfendes Element zwischen NPH3 und diversen ARFs fungiert und so eine phototrope Signaltransduktion von phot1 bis hin zur Bildung von Transportvesikeln und PIN/Auxin-Umverteilung realisiert werden kann (Abb. 53A).

Zudem ist festzuhalten, dass die beobachtete Interaktion zwischen AGD12 und ARFA1C unerwartet gering ausfiel (Abb. 14; Jensen et al., 2000). Eine Erklärung hierfür ist, dass AGD12 weit stärker an andere ARFs bindet. Alternativ könnte dies auch Beleg für eine sehr schnelle GTPase-Aktivierung von ARFA1C durch AGD12 sein. So würde AGD12 die Hydrolyse von GTP bei ARFA1C besser fördern, als bei anderen ARFs. Dabei wäre die Interaktion zwischen beiden Proteine zeitlich sehr begrenzt, da davon auszugehen ist, dass beide Reaktionspartner nach erfolgreicher Hydrolyse aufgrund von Konformationsänderungen weniger affin zueinander sind. Dies würde zu einer nur kurzen Reassemblierung des GAL4-Transkriptionsfaktors führen und somit zu geringerer α -Galaktosidase-Aktivität. Eine These, die es jedoch durch ein GTPase-Assay mit AGD12 und anderen ARFs zu belegen gilt.

Zudem weist die extrem hohe α -Galaktosidase-Aktivität bei Hefen mit AGD12 als Köder- und als Beuteprotein darauf hin, dass AGD12 wahrscheinlich *in vivo* dimerisiert (Abb. 14). Parallel dazu ist über AGD3 aus *Arabidopsis thaliana*, ASAP1 und RhoGAPs bekannt, dass diese Homodimere mittels ihrer BAR-Domänen bilden (Eberth et al., 2009; Koizumi et al., 2005; Nie et al., 2006). Folge dieser Dimerisierung ist beispielsweise die Blockade der GAP-Domäne durch die bindende BAR-Domäne, was

schließlich zur Autoinhibierung von ASAP1 und RhoGAPs führt (Eberth et al., 2009; Jian et al., 2009). Jedoch verfügt AGD12 über keine zur Dimerisierung benötigte BAR-Domäne (Abb. 15). Allerdings weisen Rop-GAPs der pflanzenspezifischen ROPs eine Form der Dimerisierung auf, die unabhängig von BAR-Domänen ist. So dimerisiert Rop-GAP2 *in vitro* unter anderem mittels Rop-GAP-Domäne und bildet mit zwei ROPs einen für die GTPase-Aktivierung nötigen 2:2-Komplex (Schaefer et al., 2011). Ein Hinweis, dass AGD12 eventuell mittels Arf-GAP-Domäne Dimere oder größere Komplexe bilden könnte. Dies wiederum könnte essentiell für eine Interaktion mit ARFs sein und eventuell Auswirkungen auf die hier dargestellten Resultate haben. So könnte die Fusion mit einer GAL4-Domäne Einfluss auf eine zur ARF-Bindung nötige Dimerisierung haben.

Im Fall von EHB1 gilt angesichts seiner starken Autoaktivität im Hefe-Zwei-Hybrid-System vorerst nur die Interaktion mit ARFB1B als relativ gesichert (Tabelle 20 & Abb. 14). Damit besteht auch hier zwischen der durch Blaulicht beeinflussbaren Interaktion zwischen ARFB1B und phot1 (Sullivan et al., 2009) sowie der Interaktion von EHB1 mit NPH3 (Knauer et al., 2011), eine funktionelle Verknüpfung dieser Proteinbindungen bezüglich der phototropen Signaltransduktion. Jedoch muss im Fall von EHB1 von einer reprimierenden Wirkung ausgegangen werden. So ist anzunehmen, dass EHB1 aufgrund der mangelnden Arf-GAP-Domäne keine GTP-Hydrolyse durch beispielsweise ARFB1B initiieren kann. Die Interaktion beider Proteine hätte demnach keine katalytische Wirkung, würde aber die Bindung des ARF mit Arf-GAPs wie AGD12 unterbinden. Somit könnte EHB1 durch seine Bindung den zyklischen GTP/GDP-Austausch an ARFs und somit die eigentliche Signaltransduktion hemmen (Abb. 53B), was sich mit seiner Rolle als negativer Effektor des Tropismus deckt.

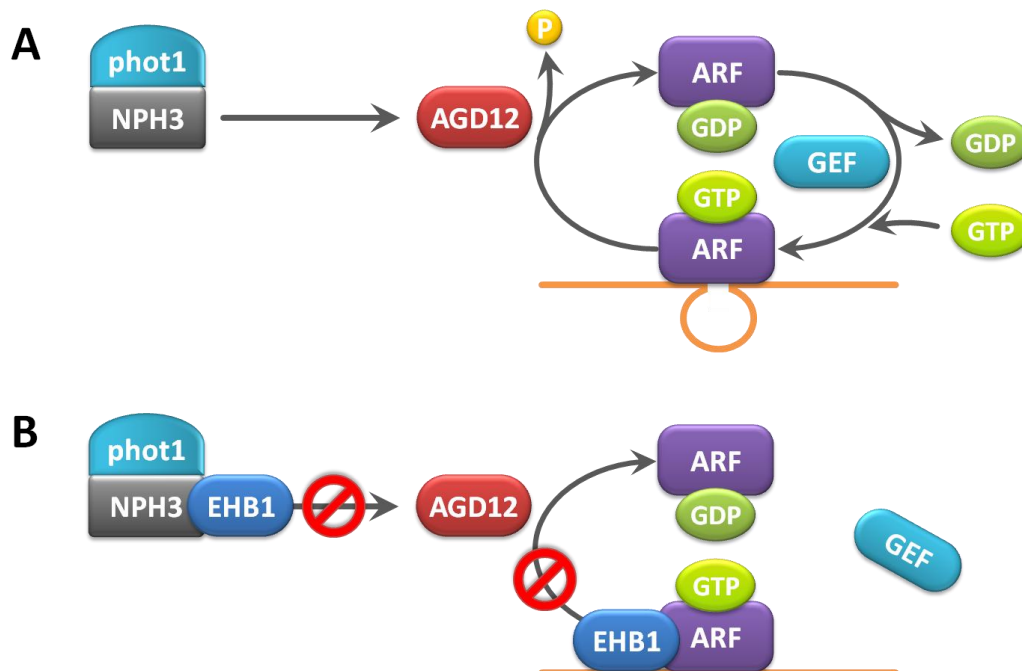


Abbildung 53: Rolle der Proteininteraktionen von AGD12 und EHB1 bei der Blaulicht-Signaltransduktion

(A) Nach Blaulicht-Anregung von phot1 wird das Signal über die Interaktion von NPH3 mit AGD12 weitergeleitet. AGD12 interagiert mit ARF und initiiert zusammen mit GEF den GDP/GTP-Austausch. Als Folge dessen werden Transportvesikel gebildet, eine Voraussetzung für die zelluläre PIN-Umverteilung. (B) EHB1 konkurriert mit AGD12 um Bindung an NPH3 und verhindert so die Signaltransduktion. EHB1 konkurriert mit AGD12 auch um Bindung an ARF und verhindert so den zyklischen GDP/GTP-Austausch. Ein Transportvesikel kann nicht gebildet werden.

Der Umstand, dass AGD12 und dessen Homologe Einfluss auf die phototrope Signaltransduktion haben (Abb. 21, Abb. 46, Abb. 50 & Abb. 52) lässt vermuten, dass die Expression der AGD-Gene durch Blaulicht gesteuert sein könnte. Jedoch muss bei der Interpretation der für AGD1 bis AGD15 nachgewiesenen Transkriptmengen bedacht werden, dass diese neben der Genexpression auch durch mRNA-Stabilität und Abbau beeinflusst werden. Die Resultate der qPCR, die vor allem Blau- und Rotlichteffekte aufzeigten (Abb. 17), können den jeweiligen Blau- und Rotlichtrezeptoren zugeschrieben werden (vergl. Seite 12). Zudem entsprach es den Erwartungen, dass eine Bestrahlung mit Grünlicht zu keiner nennenswerten Veränderung der Transkriptmengen führte. Bezogen auf Schwankungen der relativen *fold change* um mindestens $\pm 50\%$, bei denen eine deutliche Änderung der Transkriptmenge vorliegt, zeigte sich, dass die Expression von 10 AGD-Genen nicht durch Licht beeinflusst wurde. Im Fall der stark reduzierten mRNA von AGD10, sowie deutlich erhöhter mRNA von AGD15, ist von einem Rotlicht- und damit wahrscheinlich Phytochrom-gesteuerten Effekt auszugehen.

Dagegen sind die Blaulicht-abhängigen Werte bei AGD1, AGD10, AGD11 und AGD13 durch Cryptochrom, Phototropin oder einen der in jüngerer Zeit entdeckten Photorezeptoren mit LOV-Domäne zu begründen (Nelson et al., 2000; Schultz et al., 2001; Somers et al., 2000). Hierbei zeigte AGD13 speziell bei höheren Fluenzraten von $10\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ eine Verdopplung der mRNA. Dies könnte das Resultat verstärkter Anregung des Blaulichtrezeptors sein, bei der eine verstärkte Belichtung zu einer proportional höheren Expression bzw. Menge an mRNA führt. Alternativ könnte es sich hierbei jedoch auch um eine spezielle phot2-abhängige Reaktion handeln. So findet die Anregung von phot2, als auch die Erhöhung des AGD13-Transkripts, erst oberhalb von $1\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ statt (Sakai et al., 2001). Im Fall von AGD10 deutet die mit stärker werdendem UV- bzw. Blaulicht verringerte Transkriptmenge an, dass mit zunehmender Fluenzrate die Transkription von AGD10 reduziert wurde. Der Umstand, dass Rotlicht eine ebenso reprimierende Wirkung auf die AGD10-Expression hatte, lässt auf bereits bekannte Verbindungen zwischen Rot- und Blaulichtrezeptoren schließen (Ahmad et al., 1998; Jaedicke et al., 2012; Más et al., 2000).

Entgegen der Erwartung war die Expression von AGD12, trotz dessen Bedeutung für den Phototropismus (Abb. 21 & Abb. 46) und seiner PBE-Box im Promotorbereich (Abb. 18), nicht durch Blau- oder Rotlicht beeinflusst. Eine Begründung hierfür wäre, dass die Dauerbelichtung zu einer allmählichen Desensibilisierung geführt hat, bei der sich die Expression der AGD-Gene nach anfänglicher Steigerung wieder normalisierte. Eine Beobachtung, die beispielsweise auf die Transkription von SPA1 zutrifft, welche eine Stunde nach Belichtungsstart ihr Maximum erreicht und dann wieder abfällt (Fittinghoff et al., 2006). Zudem ist in Bezug auf phot1 und phot2 bekannt, dass diese sich im Lauf einer Belichtung von der Plasmamembran lösen und abgebaut werden (Kong et al., 2006; Sakamoto und Briggs, 2002), was ebenfalls zu einer Normalisierung der Blaulicht-abhängigen Transkription nach längerer Belichtung führen könnte. Abschließend muss in Betracht gezogen werden, dass aufgrund ihrer Bedeutung für den Vesikeltransport, die Mehrheit der AGD-Proteine schlicht stets vorliegen muss und diese daher mehr oder weniger konstitutiv exprimiert werden.

Auf Zellebene zeigten transiente Transformationen für AGD11, AGD12 und AGD13 eine vergleichbare Lokalisation im Zellkern und Cytoplasma (Abb. 41 & Abb. 48), was der zu erwartenden subzellulären Verteilung kleinerer GFP-Moleküle entspricht (Seibel et al., 2007). Zudem scheint eine zusätzliche Lokation an der Plasmamembran und Endomembranen durchaus möglich. So ist eine Bindung von AGD12 an diverse Phospholipide *in vitro* dokumentiert (Jensen et al., 2000). Zudem könnten die im Fall von AGD12:GFP beobachteten Akkumulationen in kleinen granulären Strukturen als Indiz für eine Lokation im Trans-Golgi-Netzwerk gesehen werden (Abb. 41C, E und F). So zeigt das im Trans-Golgi-

Netzwerk lokalisierte AGD5 ein vergleichbares Fluoreszenzmuster in Tabakzellen (Stefano et al., 2010). Des Weiteren wurde AGD12 bereits in früheren Publikationen sowie in der ePlant-Datenbank im Bereich des Golgi einordnet (Jensen et al., 2000; Min et al., 2007). Dies wurde abschließend durch die Behandlung von AGD12:GFP- und EHB1:GFP-überexprimierenden Keimlingen mit BFA und FM 4-64 untermauert (Abb. 43). So blockiert die Behandlung mit BFA den GTP-Austausch an ARFs und stört als Folge dessen die Bildung von Transportvesikeln. Der nach BFA-Behandlung noch immer aktive Clathrin-basierte Transport von Plasmamembran zum Golgi transportiert derweil FM 4-64 zu den so entstehenden BFA-Kompartimenten (Orci et al., 1991). Das in großen Teilen deckungsgleiche Fluoreszenzsignal von FM 4-64 mit AGD12:GFP bzw. EHB1:GFP zeigte, dass die beiden untersuchten Fusionsproteine in BFA-Kompartimenten vorlagen. Damit wurde bestätigt, dass sowohl AGD12 als auch EHB1 mit dem Trans-Golgi-Netzwerk assoziiert sind. Folglich sind beide Proteine subzellulär ähnlich lokalisiert wie ARFs (Min et al., 2013; Stefano et al., 2010). Dies wiederum deckt sich mit den nachgewiesenen Proteininteraktionen zwischen AGD12, EHB1 und ARFs (Tabelle 19, Tabelle 20 & Abb. 14).

Zusammenfassend weisen AGD12 und EHB1 neben ihrer Bindung an NPH3 (Knauer et al., 2011; Michalski et al., 2017) auch Interaktionen mit diversen ARFs auf, womit beide Proteine potentielle Zwischenglieder in der phototropen Signaltransduktionskette darstellen. Dabei ist davon auszugehen, dass AGD12 in der Rolle des positiven Effektors diese Signaltransduktion, ausgehend von Phototropin und NPH3, hin zur GTPase-Aktivierung bei ARFs gewährleistet. Die Bindung von EHB1 an NPH3 und ARFs steht hierzu in Konkurrenz, wodurch EHB1 als negativer Effektor diese Signaltransduktion hemmen kann (Abb. 53). Die Lokalisierung von EHB1, AGD12 und deren Homologen decken sich mit dieser Annahme. So ermöglicht die Bindung dieser Proteine an die Plasmamembran und die Assoziation mit dem Trans-Golgi-Netzwerk eine Signalweiterleitung von NPH3 oder Schwerkraftrezeptoren an der Plasmamembran, hin zu ARFs, die gebunden an Endomembranen vorliegen. Damit sind AGD12, EHB1 und ARFs ähnlich lokalisiert, wie die in der Signaltransduktion nachgelagerten PIN1- und PIN3-Proteine (Friml et al., 2002; Geldner et al., 2001), was sich auf deren Verteilung und damit auf die Verteilung von Auxin und letztlich den Gravi- und Phototropismus auswirkt.

Zusammenfassend liefern die hier gemachten Beobachtungen Hinweise darauf, dass bei der Signaltransduktion von Photo- oder Gravitropismus AGD12 und andere AGDs, als auch CAR-Proteine wie EHB1, an die gleichen Zielproteine binden und damit regulierend in die Signalweiterleitung eingreifen. Somit ist die Intensität der Signaltransduktion und abschließende Reaktion auf einen Reiz abhängig vom Verhältnis dieser Protein-Pools positiver und negativer Effektoren (Abb. 56).

5. 3. Calcium als Modulator von AGD12 und EHB1

Der Umstand, dass sowohl AGD12 als auch EHB1 über eine C2/CaLB-Domäne verfügen (Abb. 3B), führt zu der Frage, inwiefern Ca^{2+} -Ionen eine Rolle bei diesen Effektoren des Photo- und Gravitropismus spielen. Zumal beide Tropismen dafür bekannt sind, dass diese mit einer Freisetzung von Ca^{2+} einhergehen (Gehring et al., 1990; Plieth und Trewavas, 2002; Sievers et al., 1984; Stoelzle et al., 2003). Die aus dieser Fragestellung resultierenden physiologischen Experimente zeigen, neben dem Einfluss von Ca^{2+} auf Photo- und Gravitropismus, einen ganz allgemeinen Einfluss auf die verwendeten Keimlinge. So zeigte sich, dass Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration Auswirkungen auf die

Entwicklung bzw. das Längenwachstum der Pflanzen haben kann (Abb. 32). Dabei bildete Ca^{2+} im Fall einer Anzucht auf alternativem $\frac{1}{2}$ MS-Phytigel den limitierenden Faktor für die Entwicklung, was durch ein reduziertes Längenwachstum bei 10^{-7} M CaO eindeutig belegt werden konnte. Ein Umstand, der die Interpretation der darauf aufbauenden Versuche mit alternativem $\frac{1}{2}$ MS-Phytigel erschwerte. So kann nicht klar gesagt werden, ob Unterschiede bei Krümmungsreaktionen tatsächlich das Resultat einer veränderten photo- bzw. gravitropen Antwort waren oder nur auf unterschiedlichem Längenwachstum basierten. Hierzu zeigte beispielsweise die Versuchsoptimierung zum Gravitropismus (Abb. 44B), dass ein Entwicklungsunterschied von zwölf Stunden drastische Auswirkungen auf die gemessene physiologische Reaktion hatte. Ein Umstand, der auch die verkürzte Anzuchtzeit bei Versuchen zum Wurzelphototropismus begründete (Abb. 23). Im Fall des parallel verwendeten Ca^{2+} -Minimalmedium waren dagegen weitere notwendige Nährstoffe derart limitiert, dass eine veränderte Ca^{2+} -Konzentration keine Auswirkung auf das Längenwachstum hatte (Abb. 32). Demnach sind die anschließenden auf Ca^{2+} -Minimalmedium basierenden Ergebnisse als aussagekräftiger zu bewerten.

Bei Untersuchungen zum Hypokotyl-Gravitropismus auf Ca^{2+} -Minimalmedium wurden verstärkte Krümmungsreaktionen durch eine Stärkung des wahrgenommenen Scherkraftreizes mittels erhöhter Inklinations sowie Saccharose erzielt (Abb. 33). Damit deckte sich das Verhalten von *agd12-9*, *ehb1-2* und den isogenen Wildtypen mit vorangegangenen Versuchen zum Gravitropismus (Abb. 25). Der Umstand, dass alle vier Genotypen weder größere Unterschiede untereinander aufwiesen, noch durch veränderte Ca^{2+} -Konzentrationen beeinflusst wurden, lässt vermuten, dass unter diesen Umständen AGD12, EHB1 und Ca^{2+} eine untergeordnete Rolle für den Hypokotyl-Gravitropismus einnehmen. Weiter entwickelte Keimlinge auf alternativem $\frac{1}{2}$ MS-Phytigel zeigten dagegen den bekannten hypogravitropen *agd12-9*-Phänotyp, der nahezu deckungsgleich mit der *ehb1-2*-Mutante war (Abb. 34). Aus diesen Resultaten ergab sich, dass die gravitrope Reaktion des Hypokotyls durch Ca^{2+} gehemmt wird und eine Abwesenheit von AGD12 und EHB1 diesen inhibitorischen Ca^{2+} -Einfluss vermindert (Abb. 54).

Dass sich im Fall des Wurzelgravitropismus der hypogravitrope *agd12-9*-Phänotyp sowie hypergravitrope *ehb1-2*-Phänotyp weit deutlicher zeigten (Abb. 35 & Abb. 36) lässt vermuten, dass beide Proteine eine weit stärkere Rolle in der Wurzel als im Hypokotyl spielen. Dies deckt sich mit vorangegangenen Untersuchungen (Abb. 2 & Abb. 25). Ebenso glichen sich auch hier Mutante und Wildtyp durch den Einsatz von Saccharose an, wahrscheinlich bedingt durch vergrößerte Statolithen bzw. Reizwahrnehmung und der Expression homologer Gene mit zuckerabhängigen Promotorsequenzen (Abb. 18). Zudem zeigte sich, dass der Wurzelgravitropismus im Allgemeinen durch Ca^{2+} gefördert wird und dass auch hier *agd12-9* und *ehb1-2* weit weniger durch Ca^{2+} beeinflusst werden, was auf eine Verknüpfung der Funktion beider Proteine im Tropismus mit Ca^{2+} hindeutet (Abb. 54).

So weisen AGD12 und EHB1 im Bereich ihrer C2/CaLB-Domäne Ca^{2+} -Bindestellen auf (Abb. 31). Damit ist zu vermuten, dass Ca^{2+} die Bindung der C2/CaLB-Domäne an Proteine und Membranen moduliert (Nalefski und Falke, 1996). Eine Vermutung, die auch bei CAR-Proteinen beschrieben wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass CAR-Proteine Ca^{2+} -abhängig ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie mit Membranen verknüpfen können (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Rodriguez et al., 2014). Ein Mechanismus der auch auf EHB1 in Interaktion mit beispielsweise NPH3 an der Plasmamembran zutreffen könnte. Für AGD12 konnte *in vitro* eine durch Ca^{2+} verstärkte Interaktion mit diversen Phospholipiden nachgewiesen werden (Jensen et al., 2000). So ist es denkbar, dass Ca^{2+} bzw. ein durch Schwerkraftstimulus ausgelöster Ca^{2+} -Einstrom (Plieth und Trewavas, 2002) die nachgewiesene-

nen Proteininteraktionen von AGD12 und EHB1 mit NPH3 und den ARFs verstärkt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die GTPase-Aktivierung durch AGD12 Ca^{2+} -abhängig ist (Jensen et al., 2000), was zum einen damit erklärt werden könnte, dass Ca^{2+} die Bindung zwischen ARFs und der C2/CalB-Domäne von AGD12 verstärkt. Zum anderen weisen Vergleiche zwischen AGD12 und dem humanen Arf-GAP ASAP3 auf eine mögliche zusätzliche Ca^{2+} -Bindestelle im Bereich der Arf-GAP-Domäne von AGD12 hin (Abb. 31; Dümmer et al., 2016). So zeichnet sich ASAP3 im Bereich seiner Arf-GAP-Domäne durch ein für die GTPase-Aktivierung essentielles Arginin aus (Ismail et al., 2010). Im Fall von AGD12 fehlt dieses Arginin jedoch, während andere Aminosäuren, die in ASAP3 nicht vorhanden sind, in AGD12 eine negativ geladene Tasche bilden, in der Ca^{2+} anstelle von Arginin eingelagert werden kann und damit als reversibler positiver Ladungsträger fungieren könnte (Dümmer et al., 2016). Somit ist es denkbar, dass erst bei Anwesenheit von Ca^{2+} AGD12 in der Lage ist diese kleinen GTPasen zu aktivieren. Ein Mechanismus, der durch eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration wie im Fall eines Schwerkraftreizes als Bestandteil gravitroper Signaltransduktion zum Einsatz kommen könnte. Zudem ist eine Modulierung dieses frühen Ca^{2+} -Einstroms durch umliegende bzw. apoplastischen Ca^{2+} -Konzentration denkbar und damit die Begründung für die hier gezeigten Versuche. So liegt die verwendete Konzentration von 10^{-7} M Ca^{2+} im Bereich der für das Cytosol nachgewiesenen 10 bis 200 nM Ca^{2+} (Furch et al., 2009; Kader und Lindberg, 2010; Knight et al., 1997), was im Fall einer Öffnung der prognostizierten mechanosensitiven Ca^{2+} -Kanäle durch Statolithen-Sedimentation zu einem vergleichsweise schwachen Ca^{2+} -Einstrom führen sollte. Höhere apoplastische Konzentrationen, wie die parallel verwendeten 10^{-3} M Ca^{2+} , resultieren aufgrund des steileren Konzentrationsgradienten demnach in einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom bei gleichem gravitropen Stimulus. Das Resultat ist ein beschleunigter zyklischer GTP/GDP-Austausch durch AGD12, der letztlich über verstärkte PIN- und Auxin-Umverteilung zu der dargestellten verstärkten gravitropen Reaktion der Wurzel führt (Abb. 35 & Abb. 36).

Zusätzlich zu diesem Ca^{2+} -Einstrom bei der frühen gravitropen Signaltransduktion existiert jedoch ein zweites nachgelagertes Ca^{2+} -Signal, welches durch Auxin initiiert wird (Felle, 1988; Monshausen et al., 2011). Bedenkt man den Umstand, dass es sich dabei eventuell um andere Ca^{2+} -Kanäle, jedoch mit Ca^{2+} um den gleichen *second messenger* handelt, ist hier eine positive Rückkopplung zu AGD12 denkbar. Folglich könnte der AUX1-abhängige Auxin- und Ca^{2+} -Einstrom zu einer weiteren Beschleunigung des zyklischen GTP/GDP-Austausch durch AGD12 führen. Denkbar, dass dies einer Weiterleitung des Signals vom Ort der Perzeption zum Ort der Reaktion dient, indem Auxin und/oder Ca^{2+} -Signale transportiert werden. So werden neben dem basipetalen und akropetalen Transport von Auxin (Müller et al., 1998; Okada et al., 1991) auch Ca^{2+} -abhängige Membranpotentiale nach dem Muster eines biphasischen Ca^{2+} -Signals durch die Pflanze transportiert (Furch et al., 2007, 2009). Zudem lässt sich die allgemein hemmende Wirkung von Ca^{2+} auf den Hypokotyl-Gravitropismus sowie fördernde Wirkung auf den Wurzelgravitropismus durch diese Verknüpfung von Auxin- und Ca^{2+} -Einstrom erklären. So weisen Hypokotyl und Wurzel eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Auxin auf, was zu den bekannten entgegengesetzten Krümmungsreaktionen beider Organe führt. Im Detail greift der Umstand, dass Auxin nur bis zu einem gewissen Optimum Zellelongation fördert (Karcz et al., 1990). Wird dieses Optimum überschritten, kommt es bei zunehmender Auxinkonzentration zur Bildung von Ethylen und als Folge dessen zu einer Hemmung des Streckungswachstums (McKeon und Yang, 1987). Dabei könnte eine erhöhte apoplastische Ca^{2+} -Konzentration einen stärkeren Auxin-induzierten Ca^{2+} -Einstrom zu Folge haben, was wiederum die tatsächlich vorherrschende Auxinkonzentration künstlich über das Optimum hinaus erhöht. Als Folge dessen führt die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration beim Hypokotyl zu einer vermeintlichen Überschreitung der optimalen Auxinkon-

zentration. Betroffene Zellen der unteren Hypokotylseite strecken sich somit geringer. Folglich wird die negativ gravitrope Hypokotyl-Krümmung, welche auf Auxin-induzierte Zellelongation basiert (Cholodny, 1924; Friml et al., 2002; Went, 1926), durch eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration inhibiert (Abb. 34 & Abb. 54). Dem entgegen wird die positiv gravitrope Krümmung der Wurzel, welche auf Auxin-induzierter Wachstumshemmung basiert (Hou et al., 2004), durch erhöhte Ca^{2+} -Konzentration stimuliert (Abb. 35, Abb. 36 & Abb. 54). Unterstützend dazu zeigten bereits Untersuchungen an Mais-Keimlingen, dass sowohl Auxin, als auch Ca^{2+} das Streckungswachstum der Wurzel inhibieren (Hasenstein und Evans, 1986). So führt ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom zu einer noch stärkeren Hemmung der Zellelongation an der unteren Wurzelseite und folglich zu einer verstärkten gravitropen Krümmung. Derartige nachgelagerte Ca^{2+} -Effekte müssen jedoch nicht direkt mit AGD12 und EHB1 verknüpft sein.

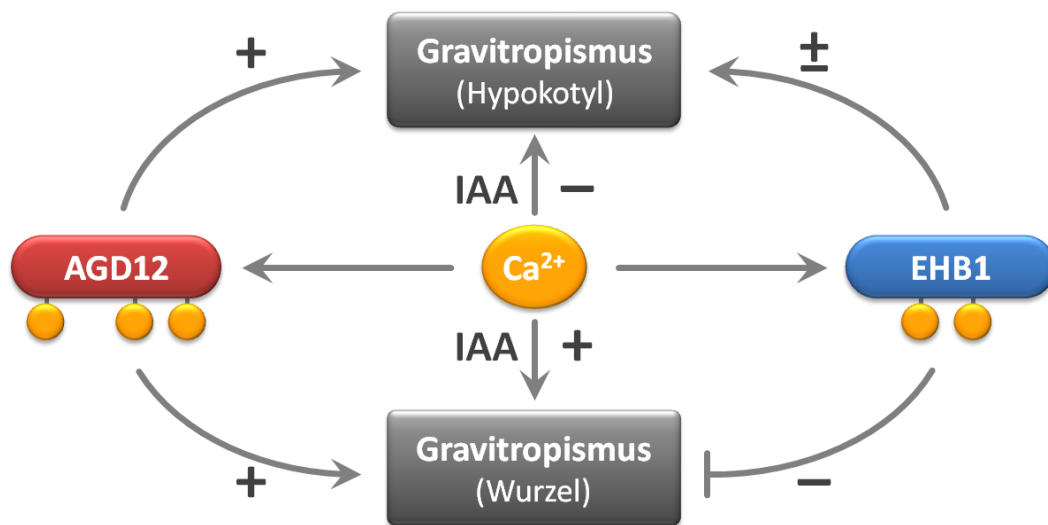


Abbildung 54: Einfluss von AGD12, EHB1 und Ca^{2+} auf Gravitropismus

Zusammenfassung zur Ca^{2+} -Abhängigkeit der gravitropen Reaktion: AGD12 ist ein positiver Effektor für Gravitropismus von Hypokotyl und Wurzel. EHB1 ist ein negativer Effektor des Gravitropismus der Wurzel und allgemeiner Effektor für Gravitropismus des Hypokotyls. Ca^{2+} moduliert den Einfluss beider Proteine beim Gravitropismus. Zudem beeinflusst Ca^{2+} , induziert durch Auxin, den Gravitropismus des Hypokotyls negativ bzw. der Wurzel positiv.

Im Fall des Hypokotyl-Phototropismus bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen fielen die Versuchsergebnisse (Abb. 37 & Abb. 38), bedingt durch den oft antagonistisch wirkenden Gravitropismus, weit weniger eindeutig aus (Abb. 55). So war die erkennbare allgemeine Förderung des Hypokotyl-Phototropismus durch Ca^{2+} auf den entgegen wirkenden Hypokotyl-Gravitropismus zurück zu führen, der bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen gehemmt wird (Abb. 34). Somit kam es in Folge eines verringerten Schwerkraftreizes bei Clinostatisierung zur Annäherung der Krümmungswerte bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen (Abb. 37). Die zusätzlich clinostatisierten Dunkelkontrollen zeigten jedoch, dass der geringe Entwicklungsstand der Keimlinge auf Ca^{2+} -Minimalmedium diese empfindlicher gegenüber der geringen einwirkenden Zentrifugalkraft durch Clinostatisierung machte. Vergleichbare Artefakte durch Clinostatisierung zwei Tage alter Keimlinge bei Wurzelphototropismus-Versuchen (Abb. 24) untermauern die Vermutung, dass der Entwicklungsstand der Keimlinge hierbei eine wichtige Rolle spielte. Zudem wies das für *agd12-9* typische hypogravitrope bzw. für *ehb1-2* hypergravitrope Krümmungsverhalten auf einen Schwerkraftstimulus (Zentrifugalkraft) wäh-

rend des Versuchs hin. Demnach kann auch bei belichteten Keimlingen ein gravitroper Einfluss nicht ausgeschlossen werden. Eine durch das Fehlen von AGD12 oder EHB1 veränderte Sensibilität der Keimlinge gegenüber Ca^{2+} war, anders als beim Gravitropismus, beim Phototropismus jedoch nicht festzustellen. Im Fall der weiter entwickelten Keimlinge auf alternativem $\frac{1}{2}$ MS-Phytigel (Abb. 38) wurde eine stichhaltige Ergebnisinterpretation, neben dem antagonistisch wirkenden Gravitropismus, zusätzlich durch das ungleichmäßige Wachstum erschwert (Abb. 32). So könnte die vermeintlich durch Ca^{2+} beeinflusste phototrope Reaktion von *ehb1-2* ebenso Resultat eines allgemein veränderten Streckungswachstums gewesen sein, wobei diesbezüglich unklar ist, welchen Einfluss dies auf den Tropismus hatte. So könnte ein starkes Längenwachstum einerseits mit einer starken Krümmungsreaktion einhergehen. Andererseits könnten längere und damit ausdifferenzierte Keimlinge ein geringeres Potential zum Krümmen besitzen, da sie weniger sensibel auf Licht und Schwerkraft reagieren oder ihre Zellen bereits weiter ausdifferenziert sind. Aufgrund dieser Faktoren ist eine genaue Aufschlüsselung der Ergebnisse in diesem Fall nicht möglich.

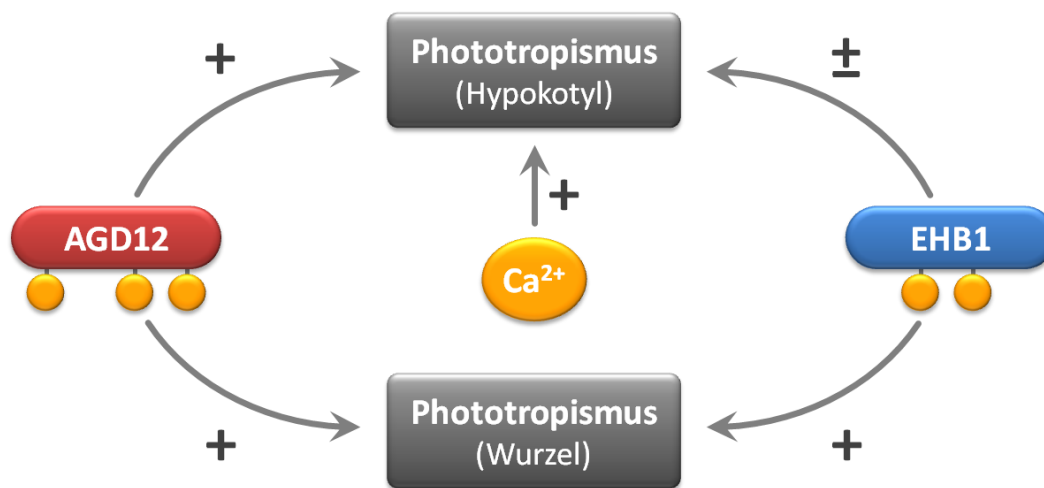


Abbildung 55: Einfluss von AGD12, EHB1 und Ca^{2+} auf Phototropismus

Zusammenfassung zur Calcium-Abhängigkeit beim Phototropismus: AGD12 ist ein positiver Effektor, EHB1 fungiert abhängig vom Versuch entweder als ein negativer oder positiver Effektor des Hypokotyl-Phototropismus. Ca^{2+} beeinflussen den Hypokotyl-Phototropismus positiv, jedoch nicht über AGD12 und EHB1, da die Mutanten ähnlich wie entsprechende Wildtypen auf Ca^{2+} reagieren. Der Wurzel-Phototropismus wird von AGD12 als auch EHB1 positiv beeinflusst.

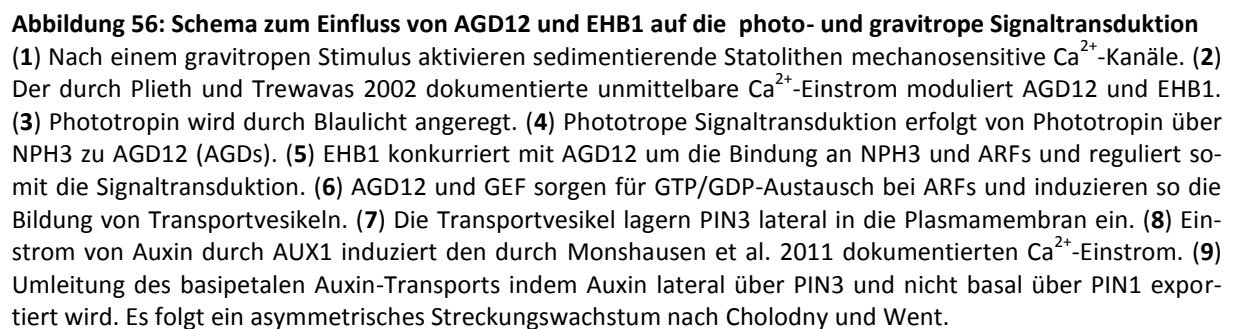
Zusammenfassend gibt es vielseitige Indizien, dass die Wirkung von AGD12 und EHB1 mit der Freisetzung von Ca^{2+} assoziiert ist. So deutet neben ihrer Struktur mit den putativen Ca^{2+} -Bindestellen (Abb. 31) auch die Ca^{2+} -abhängige Membranbindung von AGD12 und CAR-Proteinen sowie Ca^{2+} -abhängige GTPase-Aktivierung durch AGD12 auf eine entsprechende Verknüpfung hin (Jensen et al., 2000; Rodriguez et al., 2014). Dies wird ebenso durch den Umstand gestützt, dass das Fehlen von AGD12 bzw. EHB1 zu einer Verringerung des Ca^{2+} -Einflusses auf die gravitrope Krümmung führte. Eine Beobachtung, die für den Phototropismus in dieser Form nicht gemacht werden konnte, obwohl auch dessen Signaltransduktion mit der Freisetzung von Ca^{2+} assoziiert ist (Baum et al., 1999; Gehring et al., 1990). Jedoch handelt es sich dabei vermutlich um einen durch Auxin induzierten Ca^{2+} -Einstrom, wie er auch für gravitrope Reaktionen bekannt ist (Monshausen et al., 2011). Im Gegensatz dazu sind AGD12 und EHB1 entsprechend den Resultaten dieser Arbeit in weit früheren Abschnitten der Signaltransduktion funktionell aktiv (Abb. 56). So ist anzunehmen, dass ihre Funktion und Bindung an diverse Interakti-

onspartner durch den unmittelbaren Ca^{2+} -Einstrom nach Schwerkraftstimulus moduliert werden (Plieth und Trewavas, 2002). Ein Ca^{2+} -Einstrom, der wie bereits erwähnt, sehr wahrscheinlich durch Aktivierung eines mechanosensitiven Kanals in Folge der Statolithen-Sedimentation ausgelöst wird. Ob es sich dabei um den mit Gravitropismus assoziierten Ca^{2+} -Kanal CNGC14 handelt (Shih et al., 2015) oder dieser nur ein nachgelagerter durch Auxin induzierter Kanal ist, bleibt gegenwärtig jedoch unklar.

5. 4. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt sich, dass das Arf-GAP AGD12 einen positiven Einfluss auf die Signaltransduktion des Gravi- und Phototropismus in *Arabidopsis thaliana* hat. So wies die hier untersuchte Mutante *agd12-9* einen hypophototropen sowie hypogravitropen Phänotyp auf. Damit verhielt sie sich entgegengesetzt zur hypergravitropen Mutante *ehb1-2*. Die Ausprägung beider Phänotypen wurde durch die Parameter Fluenzrate, Inklinationswinkel, Saccharose und Ca^{2+} beeinflusst. So zeigte die gravitrope Reaktion von *agd12-9* und *ehb1-2* eine verringerte Reaktion auf Ca^{2+} . Ein Hinweis, dass AGD12 und EHB1 mit dem durch Plieth und Trewavas 2002 entdeckten biphasischen Ca^{2+} -Signal nach Schwerkraftstimulus assoziiert sein könnten. So ist angesichts des Aufbaus von AGD12 und EHB1 davon auszugehen, dass beide Proteine durch die Bindung von Ca^{2+} moduliert werden. Demnach könnte neben ihrer Membranbindung auch die für AGD12 und EHB1 nachgewiesenen Interaktionen mit NPH3 und diversen ARFs durch Ca^{2+} beeinflusst werden. Dabei konkurriert EHB1 als Antagonist von AGD12 vermutlich um die Bindung an NPH3 und ARFs. Folglich stellt EHB1 einen negativen Effektor der Signaltransduktion ohne katalytisch aktive Arf-GAP-Domäne dar. Der positive Effektor AGD12 ist dagegen in der Lage, eine Signaltransduktion zwischen NPH3 und ARFs zu vollziehen. Dabei ist AGD12 zusammen mit GEF-Proteinen wie GNOM am zyklischen GTP/GDP-Austausch der ARFs beteiligt. Die Folge ist die Bildung von Transportvesikeln, welche beispielsweise PIN-Proteine mittels Trans-Golgi-Netzwerk umverteilen. Das abschließende Resultat dieser Umverteilung ist der Aufbau eines Auxingradienten, gefolgt von photo- bzw. gravitroper Krümmung durch ein asymmetrisches Wachstum der Pflanze.

Es muss davon ausgegangen werden, dass AGD12 und EHB1 nur beispielhafte Vertreter der AGD- bzw. CAR-Proteinfamilie sind, ähnlich wie die vergleichsweise gut erforschten Proteine ARFA1C und GNOM jeweils nur Vertreter ihrer ARF- bzw. GEF-Proteinfamilien in *Arabidopsis thaliana* darstellen. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, dass mehrere der 15 AGD-Proteine als positive Effektoren des Photo- und Gravitropismus fungieren. Ebenso sind neben EHB1 eventuell weitere CAR-Proteine in der Lage, als negative Effektoren zu wirken. So ist es denkbar, dass Gruppen diverser AGDs, CARs und GEFs eine Vielzahl unterschiedlicher ARFs und dadurch das Trans-Golgi-Netzwerk beeinflussen. Eine Veränderung dieses Equilibriums der Proteinfamilien führt demnach zu Veränderungen des intrazellulären Proteintransports. Dieser Umstand bildet höchstwahrscheinlich die Grundlage für eine Vielzahl physiologischer Reaktionen der Pflanze, wozu letztlich auch Photo- und Gravitropismus zählen.



6. Literaturverzeichnis

Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wiśniewska, J., Moulinier–Anzola, J.C., Sieberer, T., Friml, J., and Luschig, C. (2006). Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat. Cell Biol.* 8, 249–256.

Ahmad, M. (1999). Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 230–235.

Ahmad, M., and Cashmore, A.R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366, 162–166.

Ahmad, M., and Cashmore, A.R. (1997). The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 11, 421–427.

Ahmad, M., Lin, C., and Cashmore, A.R. (1995). Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J.* 8, 653–658.

Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O., and Cashmore, A.R. (1998). The CRY1 Blue Light Photoreceptor of *Arabidopsis* Interacts with Phytochrome A In Vitro. *Mol. Cell* 1, 939–948.

Ahmad, M., Grancher, N., Heil, M., Black, R.C., Giovani, B., Galland, P., and Lardemer, D. (2002). Action Spectrum for Cryptochrome-Dependent Hypocotyl Growth Inhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 774–785.

Ahmad, M., Galland, P., Ritz, T., Wiltshko, R., and Wiltshko, W. (2007). Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 225, 615–624.

Aihara, Y., Tabata, R., Suzuki, T., Shimazaki, K., and Nagatani, A. (2008). Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *Plant J.* 56, 364–375.

Amann, K.J., and Pollard, T.D. (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15009–15013.

Andel, F., Lagarias, J.C., and Mathies, R.A. (1996). Resonance Raman Analysis of Chromophore Structure in the Lumi-R Photoproduct of Phytochrome. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 15997–16008.

Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., and Chabre, M. (1997). N-Terminal Hydrophobic Residues of the G-Protein ADP-Ribosylation Factor-1 Insert into Membrane Phospholipids upon GDP to GTP Exchange. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 4675–4684.

Aoyama, T., and Chua, N.H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 11, 605–612.

Baldwin, K.L., Strohm, A.K., and Masson, P.H. (2013). Gravity Sensing and Signal Transduction in Vascular Plant Primary Roots. *Am. J. Bot.* 100, 126–142.

- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994).** COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895–907.
- Bar-Peled, M., Conceicao, A., Frigerio, L., and Raikhel, N.V. (1995).** Expression and Regulation of aERD2, a Gene Encoding the KDEL Receptor Homolog in Plants, and Other Genes Encoding Proteins Involved in ER-Golgi Vesicular Trafficking. *Plant Cell* 7, 667–676.
- Baum, G., Long, J.C., Jenkins, G.I., and Trewavas, A.J. (1999).** Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13554–13559.
- Bayram, Ö., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., and Braus, G.H. (2008).** More Than a Repair Enzyme: *Aspergillus nidulans* Photolyase-like CryA Is a Regulator of Sexual Development. *Mol. Biol. Cell* 19, 3254–3262.
- van Bel, A.J.E., and Hess, P.H. (2008).** Hexoses as phloem transport sugars: the end of a dogma? *J. Exp. Bot.* 59, 261–272.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., and Feldmann, K.A. (1996).** *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948–950.
- Bento, C.F., Puri, C., Moreau, K., and Rubinsztein, D.C. (2013).** The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *J Cell Sci* 126, 1059–1069.
- Bhaskar, P.B., Venkateshwaran, M., Wu, L., Ané, J.-M., and Jiang, J. (2009).** *Agrobacterium*-Mediated Transient Gene Expression and Silencing: A Rapid Tool for Functional Gene Assay in Potato. *PLoS ONE* 4.
- Bhoo, S.H., Davis, S.J., Walker, J., Karniol, B., and Vierstra, R.D. (2001).** Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* 414, 776–779.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Blancaflor, E.B., Fasano, J.M., and Gilroy, S. (1998).** Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. *Plant Physiol.* 116, 213–222.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., and Fischer, R. (2005).** The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol. CB* 15, 1833–1838.
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N.D., and Satiat-Jeunemaitre, B. (2004).** FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J. Microsc.* 214, 159–173.
- Boonsirichai, K., Sedbrook, J.C., Chen, R., Gilroy, S., and Masson, P.H. (2003).** ALTERED RESPONSE TO GRAVITY is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell* 15, 2612–2625.
- Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., Parker, M.W., Toole, E.H., and Toole, V.K. (1952a).** A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 38, 662–666.

Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., and Parker, M.W. (1952b). The reaction controlling floral initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 38, 929–934.

Brautigam, C.A., Smith, B.S., Ma, Z., Palnitkar, M., Tomchick, D.R., Machius, M., and Deisenhofer, J. (2004). Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12142–12147.

Briggs, W.R. (1963). Mediation of Phototropic Responses of Corn Coleoptiles by Lateral Transport of Auxin. *Plant Physiol.* 38, 237–247.

Briggs, W.R. (2014). Phototropism: some history, some puzzles, and a look ahead. *Plant Physiol.* 164, 13–23.

Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., and Schlattner, U. (2009). Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2763–2788.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.

Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W., and Hendricks, S.B. (1959). Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45, 1703–1708.

Çakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., and Atanassova, R. (2003). A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Absciscic Acid Signaling. *Plant Cell* 15, 2165–2180.

Caspar, T., and Pickard, B.G. (1989). Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis*: Implications for the starch-statolith theory of gravity sensing. *Planta* 177, 185–197.

Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Béraud-Dufour, S., Jackson, C.L., and Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384, 481–484.

Chevreau, E., Mourgues, F., Neveu, M., and Chevalier, M. (1997). Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaves of pear. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 33, 173–179.

Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9578–9582.

Cholodny (1924). Über die hormonale Wirkung der Organspitze bei der geotropischen Krümmung. *Berichte Dtsch. Bot. Ges.* 42, 356–362.

Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., and Briggs, W.R. (1998). *Arabidopsis* NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science* 282, 1698–1701.

Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., and Briggs, W.R. (1999). LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8779–8783.

- Christie, J.M., Swartz, T.E., Bogomolni, R.A., and Briggs, W.R. (2002).** Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J.* 32, 205–219.
- Christie, J.M., Arvai, A.S., Baxter, K.J., Heilmann, M., Pratt, A.J., O'Hara, A., Kelly, S.M., Hothorn, M., Smith, B.O., Hitomi, K., et al. (2012).** Plant UVR8 Photoreceptor Senses UV-B by Tryptophan-Mediated Disruption of Cross-Dimer Salt Bridges. *Science* 335, 1492–1496.
- Clark, J., Moore, L., Krasinskas, A., Way, J., Battey, J., Tamkun, J., and Kahn, R.A. (1993).** Selective amplification of additional members of the ADP-ribosylation factor (ARF) family: cloning of additional human and *Drosophila* ARF-like genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8952–8956.
- Clontech Laboratories Inc. (2008).** Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 User Manual.
- Clontech Laboratories Inc. (2009).** Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.
- Cosson, P., and Letourneur, F. (1997).** Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 484–487.
- Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M., and Cassel, D. (1995).** The ARF1 GTPase-Activating Protein: Zinc Finger Motif and Golgi Complex Localization. *Science* 270, 1999–2002.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003).** A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiol.* 133, 462–469.
- Darwin, C. (1859).** *On the Origin of Species* (J. Murray).
- Darwin, C., and Darwin, F. (1881).** *The power of movement in plants* (New York, D. Appleton and Company).
- Davis, S.J., Vener, A.V., and Vierstra, R.D. (1999).** Bacteriophytochromes: Phytochrome-Like Photoreceptors from Nonphotosynthetic Eubacteria. *Science* 286, 2517–2520.
- Dehesh, K., Franci, C., Parks, B.M., Seeley, K.A., Short, T.W., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (1993).** *Arabidopsis* HY8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* 5, 1081–1088.
- Desfeux, C., Clough, S.J., and Bent, A.F. (2000).** Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of *Agrobacterium*-Mediated Transformation by the *Arabidopsis* Floral-Dip Method. *Plant Physiol.* 123, 895–904.
- Devlin, P.F., Patel, S.R., and Whitelam, G.C. (1998).** Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1479–1487.
- Dieterle, M., Thomann, A., Renou, J.-P., Parmentier, Y., Cognat, V., Lemonnier, G., Müller, R., Shen, W.-H., Kretsch, T., and Genschik, P. (2005).** Molecular and functional characterization of *Arabidopsis* Cullin 3A. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 41, 386–399.
- Ding, Z., Galván-Ampudia, C.S., Demarsy, E., Łangowski, Ł., Kleine-Vehn, J., Fan, Y., Morita, M.T., Tasaka, M., Fankhauser, C., Offringa, R., et al. (2011).** Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* 13, 447–452.

- Donaldson, J.G., and Jackson, C.L. (2000).** Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 475–482.
- Doyle, J., and Doyle, J. (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Dümmer, M., Michalski, C., Forreiter, C., and Galland, P. (2015a).** Phenotypic Reversal in *Arabidopsis thaliana*: Sucrose as a Signal Molecule Controlling the Phenotype of Gravi- and Photo-tropism Mutants. *J. Plant Growth Regul.* 35, 430–439.
- Dümmer, M., Forreiter, C., and Galland, P. (2015b).** Gravitropism in *Arabidopsis thaliana*: Root-specific action of the EHB gene and violation of the resultant law. *J. Plant Physiol.* 189, 24–33.
- Dümmer, M., Michalski, C., Essen, L.-O., Rath, M., Galland, P., and Forreiter, C. (2016).** EHB1 and AGD12, two calcium-dependent proteins affect gravitropism antagonistically in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 206, 114–124.
- Eberth, A., Lundmark, R., Gremer, L., Dvorsky, R., Koessmeier, K.T., McMahon, H.T., and Ahmadian, M.R. (2009).** A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem. J.* 417, 371–377.
- Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1998).** CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95, 669–679.
- d’Enfert, C., Gensse, M., and Gaillardin, C. (1992).** Fission yeast and a plant have functional homologues of the Sar1 and Sec12 proteins involved in ER to Golgi traffic in budding yeast. *EMBO J.* 11, 4205–4211.
- Esau, K. (1969).** The phloem (Gebr. Borntraeger).
- Esau, K. (1973).** Comparative Structure of Companion Cells and Phloem Parenchyma Cells in *Mimosa pudica* L. *Ann. Bot.* 37, 625–632.
- Fankhauser, C. (2001).** The Phytochromes, a Family of Red/Far-red Absorbing Photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 276, 11453–11456.
- Fankhauser, C., and Chory, J. (1999).** Photomorphogenesis: Light receptor kinases in plants! *Curr. Biol.* 9, R123–R126.
- Fankhauser, C., and Christie, J.M. (2015).** Plant phototropic growth. *Curr. Biol.* CB 25, R384–389.
- Fasano, J.M., Swanson, S.J., Blancaflor, E.B., Dowd, P.E., Kao, T., and Gilroy, S. (2001).** Changes in Root Cap pH Are Required for the Gravity Response of the *Arabidopsis* Root. *Plant Cell* 13, 907–921.
- Felle, H. (1988).** Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* 174, 495–499.
- Fields, S., and Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245–246.
- Fittinghoff, K., Laubinger, S., Nixdorf, M., Fackendahl, P., Baumgardt, R.-L., Batschauer, A., and Hoecker, U. (2006).** Functional and expression analysis of *Arabidopsis* SPA genes during seedling photomorphogenesis and adult growth. *Plant J.* 47, 577–590.

- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., and Paris, S. (1995).** Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg^{2+} levels. *J. Biol. Chem.* 270, 1337–1341.
- Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J., and Whitelam, G.C. (2003).** Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131, 1340–1346.
- Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., and Palme, K. (2002).** Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415, 806–809.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jürgens, G. (2003).** Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147–153.
- Furch, A.C.U., Hafke, J.B., Schulz, A., Bel, V., and E, A.J. (2007).** Ca^{2+} -mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* 58, 2827–2838.
- Furch, A.C.U., van Bel, A.J.E., Fricker, M.D., Felle, H.H., Fuchs, M., and Hafke, J.B. (2009).** Sieve Element Ca^{2+} Channels as Relay Stations between Remote Stimuli and Sieve Tube Occlusion in *Vicia faba*. *Plant Cell* 21, 2118–2132.
- Galland, P. (2002).** Tropisms of *Avena* coleoptiles: sine law for gravitropism, exponential law for photogravitropic equilibrium. *Planta* 215, 779–784.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K. (1998).** Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282, 2226–2230.
- Garner, W.W., and Allard, H.A. (1922).** Photoperiodism, the Response of the Plant to Relative Length of Day and Night. *Science* 55, 582–583.
- Gaynor, E.C., and Emr, S.D. (1997).** COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J. Cell Biol.* 136, 789–802.
- Gebert, M., Meschenmoser, K., Svidová, S., Weghuber, J., Schweyen, R., Eifler, K., Lenz, H., Weyand, K., and Knoop, V. (2009).** A Root-Expressed Magnesium Transporter of the MRS2/MGT Gene Family in *Arabidopsis thaliana* Allows for Growth in Low- Mg^{2+} Environments. *Plant Cell* 21, 4018–4030.
- Gegear, R.J., Casselman, A., Waddell, S., and Reppert, S.M. (2008).** Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature* 454, 1014–1018.
- Gehring, C.A., Williams, D.A., Cody, S.H., and Parish, R.W. (1990).** Phototropism and geotropism in maize coleoptiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. *Nature* 345, 528–530.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.-D., Jürgens, G., and Palme, K. (2001).** Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413, 425–428.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., and Jürgens, G. (2003).** The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF Mediates Endosomal Recycling, Auxin Transport, and Auxin-Dependent Plant Growth. *Cell* 112, 219–230.

- Goddard, A., Ladds, G., and Davey, J. (2005).** Development of a semi-quantitative plate-based α -galactosidase gene reporter for *Schizosaccharomyces pombe* and its use to isolate a constitutively active Mam2. *Yeast* 22, 31–41.
- Grierson, C., Du, J.-S., De Torres Zabala, M., Beggs, K., Smith, C., Holdsworth, M., and Bevan, M. (1994).** Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* 5, 815–826.
- Griffin, E.A., Staknis, D., and Weitz, C.J. (1999).** Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 286, 768–771.
- Grolig, F., Eibel, P., Schimek, C., Schapat, T., Dennison, D.S., and Galland, P.A. (2000).** Interaction between Gravitropism and Phototropism in Sporangiophores of *Phycomyces blakesleeanus*. *Plant Physiol.* 123, 765–776.
- Guilfoyle, T.J., Ulmasov, T., and Hagen, G. (1998).** The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 54, 619–627.
- Gupta, A.K., and Kaur, N. (2005).** Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30, 761–776.
- Haberlandt (1900).** Über die Perception des geotropischen Reizes. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 18, 261–272.
- Hager, A., Menzel, H., and Krauss, A. (1971).** Versuche und Hypothese zur Primarwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta*.
- Harper, R.M., Stowe-Evans, E.L., Luesse, D.R., Muto, H., Tatematsu, K., Watahiki, M.K., Yamamoto, K., and Liscum, E. (2000).** The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell* 12, 757–770.
- Harper, S.M., Neil, L.C., and Gardner, K.H. (2003).** Structural Basis of a Phototropin Light Switch. *Science* 301, 1541–1544.
- Harrison, S.J., Mott, E.K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J.C., and Cottage, A. (2006).** A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2, 19.
- Hartmann, E., Klingenberg, B., and Bauer, L. (1983).** Phytochrome-mediated phototropism in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* BRID. *Photochem. Photobiol.* 38, 599–603.
- Hasenstein, K.-H., and Evans, M.L. (1986).** Calcium Dependence of Rapid Auxin Action in Maize Roots 1. *Plant Physiol.* 81, 439–443.
- Heyers, D., Manns, M., Luksch, H., Güntürkün, O., and Mouritsen, H. (2007).** A Visual Pathway Links Brain Structures Active during Magnetic Compass Orientation in Migratory Birds. *PLoS ONE* 2.
- Hoffman, P.D., Batschauer, A., and Hays, J.B. (1996).** PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol. Gen. Genet. MGG* 253, 259–265.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., et al. (1999).** Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627–630.

Hou, G., Kramer, V.L., Wang, Y.-S., Chen, R., Perbal, G., Gilroy, S., and Blancaflor, E.B. (2004). The promotion of gravitropism in *Arabidopsis* roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalinization of the columella cytoplasm and a persistent lateral auxin gradient. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 39, 113–125.

Hsu, D.S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R.-P., Todo, T., Wei, Y.-F., and Sancar, A. (1996). Putative Human Blue-Light Photoreceptors hCRY1 and hCRY2 Are Flavoproteins. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 13871–13877.

Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gärtner, W., Wilde, A., and Börner, T. (1997). A prokaryotic phytochrome. *Nature* 386, 663–663.

Iino, M., Tarui, Y., and Uematsu, C. (1996). Gravitropism of maize and rice coleoptiles: dependence on the stimulation angle. *Plant Cell Environ.* 19, 1160–1168.

Inada, S., Ohgishi, M., Mayama, T., Okada, K., and Sakai, T. (2004). RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, 887–896.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.

Invitrogen (2003). Gateway® Technology Manual.

Invitrogen (2010). Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix Manual.

Invitrogen (2015). Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix Manual.

Ismail, S.A., Vetter, I.R., Sot, B., and Wittinghofer, A. (2010). The structure of an Arf-ArfGAP complex reveals a Ca²⁺ regulatory mechanism. *Cell* 141, 812–821.

Jaedicke, K., Lichtenthäler, A.L., Meyberg, R., Zeidler, M., and Hughes, J. (2012). A phytochrome-phototropin light signaling complex at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 12231–12236.

James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425–1436.

Jarillo, J.A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Cashmore, A.R. (2001). Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410, 952–954.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901–3907.

Jékely, G. (2003). Small GTPases and the evolution of the eukaryotic cell. *BioEssays* 25, 1129–1138.

Jenkins, G.I., and Cove, D.J. (1983). Phototropism and polarotropism of primary chloronemata of the moss *Physcomitrella patens*: responses of the wild-type. *Planta* 158, 357–364.

Jensen, R.B., Lykke-Andersen, K., Frandsen, G.I., Nielsen, H.B., Haseloff, J., Jespersen, H.M., Mundy, J., and Skriver, K. (2000). Promiscuous and specific phospholipid binding by domains in ZAC, a membrane-associated *Arabidopsis* protein with an ARF GAP zinc finger and a C2 domain. *Plant Mol. Biol.* 44, 799–814.

- Jian, X., Brown, P., Schuck, P., Gruschus, J.M., Balbo, A., Hinshaw, J.E., and Randazzo, P.A. (2009).** Autoinhibition of Arf GTPase-activating protein activity by the BAR domain in ASAP1. *J. Biol. Chem.* **284**, 1652–1663.
- Kader, M.A., and Lindberg, S. (2010).** Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signal. Behav.* **5**, 233–238.
- Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., and Wada, M. (2001).** *Arabidopsis* NPL1: A Phototropin Homolog Controlling the Chloroplast High-Light Avoidance Response. *Science* **291**, 2138–2141.
- Kahn, R.A., Der, C.J., and Bokoch, G.M. (1992).** The Ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *FASEB J.* **6**, 2512–2513.
- Kansup, J., Tsugama, D., Liu, S., and Takano, T. (2014).** *Arabidopsis* G-protein β subunit AGB1 interacts with NPH3 and is involved in phototropism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**, 54–57.
- Karcz, W., Stolarek, J., Pietruszka, M., and Malkowski, E. (1990).** The dose-response curves for IAA induced elongation growth and acidification of the incubation medium of *Zea mays* coleoptile segments. *Physiol. Plant.* **80**, 257–261.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002).** Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 193–195.
- Katekar, G.F., and Geissler, A.E. (1980).** Auxin Transport Inhibitors IV. Evidence of a common mode of action for a proposed class of auxin transport inhibitors: the phytotropins. *Plant Physiol.* **66**, 1190–1195.
- Kilby, N.J., Leyser, H.M., and Furner, I.J. (1992).** Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **20**, 103–112.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., and Shimazaki, K. (2001).** phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656–660.
- Kircher, S., and Schopfer, P. (2012).** Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 11217–11221.
- Kirchhausen, T. (2000).** Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 187–198.
- Kiss, J.Z., Hertel, R., and Sack, F.D. (1989).** Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **177**, 198–206.
- Kiss, J.Z., Wright, J.B., and Caspar, T. (1996).** Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* **97**, 237–244.
- Kiss, J.Z., Guisinger, M.M., Miller, A.J., and Stackhouse, K.S. (1997).** Reduced gravitropism in hypocotyls of starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **38**, 518–525.
- Kiss, J.Z., Melanie J Correll, Jack L Mullen, and Richard E. Edelman (2003).** Root phototropism: how light and gravity interact in shaping plant form. ResearchGate.
- Kleine, T., Lockhart, P., and Batschauer, A. (2003).** An *Arabidopsis* protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J.* **35**, 93–103.

- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A.R., Tasaka, M., Morita, M.T., and Friml, J. (2010).** Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 22344–22349.
- Kliebenstein, D.J., Lim, J.E., Landry, L.G., and Last, R.L. (2002).** *Arabidopsis* UVR8 Regulates Ultraviolet-B Signal Transduction and Tolerance and Contains Sequence Similarity to Human Regulator of Chromatin Condensation 1. *Plant Physiol.* *130*, 234–243.
- Knauer, T., Dümmer, M., Landgraf, F., and Forreiter, C. (2011).** A Negative Effector of Blue Light-Induced and Gravitropic Bending in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *156*, 439–447.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1997).** Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *12*, 1067–1078.
- Knoll, A.H., and Barghoorn, E.S. (1977).** Archean microfossils showing cell division from the swaziland system of South Africa. *Science* *198*, 396–398.
- Kobayashi, K., Kanno, S., Smit, B., van der Horst, G.T., Takao, M., and Yasui, A. (1998).** Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res.* *26*, 5086–5092.
- Kohchi, T., Mukougawa, K., Frankenberg, N., Masuda, M., Yokota, A., and Lagarias, J.C. (2001).** The *Arabidopsis* HY2 Gene Encodes Phytochromobilin Synthase, a Ferredoxin-Dependent Biliverdin Reductase. *Plant Cell* *13*, 425–436.
- Koizumi, K., Naramoto, S., Sawa, S., Yahara, N., Ueda, T., Nakano, A., Sugiyama, M., and Fukuda, H. (2005).** VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. *Development*.
- Koncz, C., Németh, K., Rédei, G.P., and Schell, J. (1992).** T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* *20*, 963–976.
- Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., and Schell, J. (1994).** Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In *Plant Molecular Biology Manual*, S.B. Gelvin, and R.A. Schilperoort, eds. (Springer Netherlands), pp. 53–74.
- Kong, S.-G., Suzuki, T., Tamura, K., Mochizuki, N., Hara-Nishimura, I., and Nagatani, A. (2006).** Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *45*, 994–1005.
- Koornneef, M., Rolff, E., and Spruit, C.J.P. (1980).** Genetic Control of Light-inhibited Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z. für Pflanzenphysiol.* *100*, 147–160.
- Krek, W. (2003).** BTB proteins as henchmen of Cul3-based ubiquitin ligases. *Nat. Cell Biol.* *5*, 950–951.
- Laine, E., Lamblin, F., Lacoux, J., Dupre, P., Roger, D., Sihachakr, D., and David, A. (2000).** Gelling agent influences the detrimental effect of kanamycin on adventitious budding in flax. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* *63*, 77–80.
- Landry, L.G., Stapleton, A.E., Lim, J., Hoffman, P., Hays, J.B., Walbot, V., and Last, R.L. (1997).** An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 328–332.

Larsen, P. (1969). The Optimum Angle of Geotropic Stimulation and its Relation to the Starch Statolith Hypothesis. *Physiol. Plant.* 22, 469–488.

Lee, M.H., Min, M.K., Lee, Y.J., Jin, J.B., Shin, D.H., Kim, D.H., Lee, K.-H., and Hwang, I. (2002). ADP-Ribosylation Factor 1 of *Arabidopsis* Plays a Critical Role in Intracellular Trafficking and Maintenance of Endoplasmic Reticulum Morphology in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 1507–1520.

Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases1. *J. Mol. Biol.* 317, 41–72.

Leitz, G., Kang, B.-H., Schoenwaelder, M.E.A., and Staehelin, L.A. (2009). Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing *Arabidopsis* columella cells. *Plant Cell* 21, 843–860.

Leivar, P., and Monte, E. (2014). PIFs: Systems Integrators in Plant Development. *Plant Cell* 26, 56–78.

Lemichez, E., Wu, Y., Sanchez, J.-P., Mettouchi, A., Mathur, J., and Chua, N.-H. (2001). Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes Dev.* 15, 1808–1816.

Li, H., Wu, G., Ware, D., Davis, K.R., and Yang, Z. (1998). *Arabidopsis* Rho-Related GTPases: Differential Gene Expression in Pollen and Polar Localization in Fission Yeast. *Plant Physiol.* 118, 407–417.

Li, Y., Lee, K.K., Walsh, S., Smith, C., Hadingham, S., Sorefan, K., Cawley, G., and Bevan, M.W. (2006). Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.* 16, 414–427.

Liljegren, S.J., Leslie, M.E., Darnielle, L., Lewis, M.W., Taylor, S.M., Luo, R., Geldner, N., Chory, J., Randazzo, P.A., Yanofsky, M.F., et al. (2009). Regulation of membrane trafficking and organ separation by the NEVERSHED ARF-GAP protein. *Dev. Camb. Engl.* 136, 1909–1918.

Liscum, E., and Briggs, W.R. (1995). Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* 7, 473–485.

Liscum, E., and Briggs, W.R. (1996). Mutations of *Arabidopsis* in Potential Transduction and Response Components of the Phototropic Signaling Pathway. *Plant Physiol.* 112, 291–296.

Liu, Y. j., and Lino, M. (1996). Effects of red light on the fluence–response relationship for pulse-induced phototropism of maize coleoptiles. *Plant Cell Environ.* 19, 609–614.

Louvet, O., Doignon, F., and Crouzet, M. (1997). Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system. *BioTechniques* 23, 816–818, 820.

Lu, C.-A., Lim, E.-K., and Yu, S.-M. (1998). Sugar Response Sequence in the Promoter of a Rice α -Amylase Gene Serves as a Transcriptional Enhancer. *J. Biol. Chem.* 273, 10120–10131.

Lu, Q., Tang, X., Tian, G., Wang, F., Liu, K., Nguyen, V., Kohalmi, S.E., Keller, W.A., Tsang, E.W.T., Harada, J.J., et al. (2010). *Arabidopsis* homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin. *Plant J.* 61, 259–270.

Lütcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F., and Scheele, G.A. (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* 6, 43–48.

- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E. (2009).** Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064–1068.
- MacCleery, S.A., and Kiss, J.Z. (1999).** Plastid Sedimentation Kinetics in Roots of Wild-Type and Starch-Deficient Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120, 183–192.
- Malhotra, K., Kim, S.T., Batschauer, A., Dawut, L., and Sancar, A. (1995).** Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 6892–6899.
- Más, P., Devlin, P.F., Panda, S., and Kay, S.A. (2000).** Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 408, 207–211.
- Matsuoka, D., and Tokutomi, S. (2005).** Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13337–13342.
- Mayer, U., Buttner, G., and Jurgens, G. (1993).** Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 117, 149–162.
- McElver, J., Patton, D., Rumbaugh, M., Liu, C., Yang, L.J., and Meinke, D. (2000).** The TITAN5 Gene of *Arabidopsis* Encodes a Protein Related to the ADP Ribosylation Factor Family of GTP Binding Proteins. *Plant Cell* 12, 1379–1393.
- McKeon, T.A., and Yang, S.-F. (1987).** Biosynthesis and Metabolism of Ethylene. In *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, P.J. Davies, ed. (Springer Netherlands), pp. 94–112.
- Metzner, P. (1929).** Über die Wirkung der Längskraft beim Geotropismus. *Jahrbuch der wissenschaftlichen Botanik* 325–385.
- Michalski, C. (2010).** MasterThesis: Yeast three-hybrid studies on interaction of proteins involved in early phototropic signalling in *Arabidopsis thaliana*.
- Michalski, C., Dümmer, M., Galland, P., and Forreiter, C. (2017).** Impact of EHB1 and AGD12 on Root and Hypocotyl Phototropism in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.* 1–9.
- Midon, M. (2006).** Diplomarbeit: Molekulare Analyse von EHB1, einem Protein der phototropin-induzierten Blaulichtperzeption.
- Min, M.K., Kim, S.J., Miao, Y., Shin, J., Jiang, L., and Hwang, I. (2007).** Overexpression of *Arabidopsis* AGD7 Causes Relocation of Golgi-Localized Proteins to the Endoplasmic Reticulum and Inhibits Protein Trafficking in Plant Cells. *Plant Physiol.* 143, 1601–1614.
- Min, M.K., Jang, M., Lee, M., Lee, J., Song, K., Lee, Y., Choi, K.Y., Robinson, D.G., and Hwang, I. (2013).** Recruitment of Arf1-GDP to Golgi by Glo3p-Type ArfGAPs Is Crucial for Golgi Maintenance and Plant Growth. *Plant Physiol.* 161, 676–691.
- Mittelsten Scheid, O., Paszkowski, J., and Potrykus, I. (1991).** Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 228, 104–112.
- Mittmann, F., Dienstbach, S., Weisert, A., and Forreiter, C. (2009).** Analysis of the phytochrome gene family in *Ceratodon purpureus* by gene targeting reveals the primary phytochrome responsible for photo- and polarotropism. *Planta* 230, 27–37.

- Möglich, A., Yang, X., Ayers, R.A., and Moffat, K. (2010).** Structure and function of plant photoreceptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 21–47.
- Möller, A., Sagasser, S., Wiltschko, W., and Schierwater, B. (2004).** Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften* 91, 585–588.
- Monshausen, G.B., Miller, N.D., Murphy, A.S., and Gilroy, S. (2011).** Dynamics of auxin-dependent Ca^{2+} and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 65, 309–318.
- Moss, J., and Vaughan, M. (1998).** Molecules in the ARF Orbit. *J. Biol. Chem.* 273, 21431–21434.
- Motchoulski, A., and Liscum, E. (1999).** *Arabidopsis* NPH3: A NPH1 Photoreceptor-Interacting Protein Essential for Phototropism. *Science* 286, 961–964.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., and Palme, K. (1998).** AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17, 6903–6911.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263–273.
- Nagatani, A., Reed, J.W., and Chory, J. (1993).** Isolation and Initial Characterization of *Arabidopsis* Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol.* 102, 269–277.
- Nakamura, M., Toyota, M., Tasaka, M., and Morita, M.T. (2011).** An *Arabidopsis* E3 ligase, SHOOT GRAVITROPISM9, modulates the interaction between statoliths and F-actin in gravity sensing. *Plant Cell* 23, 1830–1848.
- Nakasako, M., Iwata, T., Matsuoka, D., and Tokutomi, S. (2004).** Light-Induced Structural Changes of LOV Domain-Containing Polypeptides from *Arabidopsis* Phototropin 1 and 2 Studied by Small-Angle X-ray Scattering. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 14881–14890.
- Nalefski, E.A., and Falke, J.J. (1996).** The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 5, 2375–2390.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A., and Bartel, B. (2000).** FKF1, a Clock-Controlled Gene that Regulates the Transition to Flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101, 331–340.
- Němec (1900).** Über die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftreizes bei den Pflanzen. *Berichte Dtsch. Bot. Ges.* 18, 241–245.
- New England Biolabs (2017a).** Optimizing Restriction Endonuclease Reactions | NEB.
- New England Biolabs (2017b).** Double Digest Finder | NEB.
- Nie, Z., Hirsch, D.S., Luo, R., Jian, X., Stauffer, S., Cremesti, A., Andrade, J., Lebowitz, J., Marino, M., Ahvazi, B., et al. (2006).** A BAR domain in the N terminus of the Arf GAP ASAP1 affects membrane structure and trafficking of epidermal growth factor receptor. *Curr. Biol. CB* 16, 130–139.
- Okada, K., and Shimura, Y. (1992).** Aspects of recent developments in mutational studies of plant signaling pathways. *Cell* 70, 369–372.

Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., and Shimura, Y. (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of *Arabidopsis* Floral Bud Formation. *Plant Cell* 3, 677–684.

Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., et al. (2005). Functional Genomic Analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR Gene Family Members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and Overlapping Functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* 17, 444–463.

Orci, L., Tagaya, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J., Klausner, R.D., and Rothman, J.E. (1991). Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* 64, 1183–1195.

Palmieri, M., and Kiss, J.Z. (2005). Disruption of the F-actin cytoskeleton limits statolith movement in *Arabidopsis* hypocotyls. *J. Exp. Bot.* 56, 2539–2550.

Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.-F.F., et al. (2009). Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068–1071.

Pedmale, U.V., and Liscum, E. (2007). Regulation of phototropic signaling in *Arabidopsis* via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *J. Biol. Chem.* 282, 19992–20001.

Perdue, D.O., LaFavre, A.K., and Leopold, A.C. (1988). Calcium in the regulation of gravitropism by light. *Plant Physiol.* 86, 1276–1280.

Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J., and Jackson, C.L. (1999). Brefeldin A Acts to Stabilize an Abortive ARF–GDP–Sec7 Domain Protein Complex: Involvement of Specific Residues of the Sec7 Domain. *Mol. Cell* 3, 275–285.

Pickard, B. (1973). Geotropic Response Patterns of *Avena*-Coleoptile .1. Dependence on Angle and Duration of Stimulation. *Can. J. Bot.-Rev. Can. Bot.* 51, 1003–1021.

Plieth, C., and Trewavas, A.J. (2002). Reorientation of Seedlings in the Earth’s Gravitational Field Induces Cytosolic Calcium Transients. *Plant Physiol.* 129, 786–796.

Qiagen (2009). QuantiTect Reverse Transcription Handbook.

Qiagen (2010). QIAGEN LongRange 2Step RT-PCR Handbook.

Qiagen (2012). RNeasy® Mini Handbook.

Qiagen (2015). QIAprep® Miniprep Handbook.

Qin, M., Kuhn, R., Moran, S., and Quail, P.H. (1997). Overexpressed phytochrome C has similar photosensory specificity to phytochrome B but a distinctive capacity to enhance primary leaf expansion. *Plant J.* 12, 1163–1172.

Rashotte, A.M., DeLong, A., and Muday, G.K. (2001). Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. *Plant Cell* 13, 1683–1697.

Reboulet, J.C., Kumar, P., and Kiss, J.Z. (2010). DIS1 and DIS2 play a role in tropisms in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.* 67, 474–478.

Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M., and Chory, J. (1994). Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in *Arabidopsis* Development. *Plant Physiol.* 104, 1139–1149.

Ritzenthaler, C., Nebenführ, A., Movafeghi, A., Stussi-Garaud, C., Behnia, L., Pimpl, P., Staehelin, L.A., and Robinson, D.G. (2002). Reevaluation of the Effects of Brefeldin A on Plant Cells Using Tobacco Bright Yellow 2 Cells Expressing Golgi-Targeted Green Fluorescent Protein and COPI Antisera. *Plant Cell* 14, 237–261.

Roberts, D., Pedmale, U.V., Morrow, J., Sachdev, S., Lechner, E., Tang, X., Zheng, N., Hannink, M., Genschik, P., and Liscum, E. (2011). Modulation of phototropic responsiveness in *Arabidopsis* through ubiquitination of phototropin 1 by the CUL3-Ring E3 ubiquitin ligase CRL3(NPH3). *Plant Cell* 23, 3627–3640.

Robineau, S., Chabre, M., and Antonny, B. (2000). Binding site of brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9913–9918.

Rodriguez, L., Gonzalez-Guzman, M., Diaz, M., Rodrigues, A., Izquierdo-Garcia, A.C., Peirats-Llobet, M., Fernandez, M.A., Antoni, R., Fernandez, D., Marquez, J.A., et al. (2014). C2-domain abscisic acid-related proteins mediate the interaction of PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors with the plasma membrane and regulate abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 4802–4820.

Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., and Jones, J.D.G. (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* 20, 5556–5567.

Rook, F., Hadingham, S.A., Li, Y., and Bevan, M.W. (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell Environ.* 29, 426–434.

Rüdiger, W., Thümmler, F., Cmiel, E., and Schneider, S. (1983). Chromophore structure of the physiologically active form (P(fr)) of phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 6244–6248.

Sachs, J. (1865). Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen: Untersuchungen über die allgemeinen Lebensbedingungen der Pflanzen und die Funktionen ihrer Organe (W. Engelmann).

von Sachs, J. (1882). Über orthotrope und plagiotrope Pflanzenteile. (*Arb Bot Inst Würzburg* 2:226–284).

Sæther, N., and Iversen, T.-H. (1991). Gravitropism and starch statoliths in an *Arabidopsis* mutant. *Planta* 184, 491–497.

Sakai, T., Wada, T., Ishiguro, S., and Okada, K. (2000). RPT2. A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 225–236.

Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., and Okada, K. (2001). *Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6969–6974.

Sakamoto, K., and Briggs, W.R. (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* 14, 1723–1735.

Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U., and Briggs, W.R. (2000). Photochemical and Mutational Analysis of the FMN-Binding Domains of the Plant Blue Light Receptor, Phototropin. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 9401–9410.

- Sato, E.M., Hijazi, H., Bennett, M.J., Vissenberg, K., and Swarup, R. (2015).** New insights into root gravitropic signalling. *J. Exp. Bot.* 66, 2155–2165.
- Schaefer, A., Höhner, K., Berken, A., and Wittinghofer, A. (2011).** The unique plant RhoGAPs are dimeric and contain a CRIB motif required for affinity and specificity towards cognate small G proteins. *Biopolymers* 95, 420–433.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S., and Schmidt, R. (2004).** Silencing in *Arabidopsis* T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *Plant Cell* 16, 2561–2572.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., and Kay, S.A. (2001).** A Role for LKP2 in the Circadian Clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2659–2670.
- Sedbrook, J.C., Chen, R., and Masson, P.H. (1999).** ARG1 (altered response to gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1140–1145.
- Seibel, N.M., Eljouni, J., Nalaskowski, M.M., and Hampe, W. (2007).** Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal. Biochem.* 368, 95–99.
- Senn, A.P., and Goldsmith, M.H. (1988).** Regulation of electrogenic proton pumping by auxin and fusaric acid as related to the growth of *Avena* coleoptiles. *Plant Physiol.* 88, 131–138.
- Sherman, F. (1986).** The laboratory course manual for methods in yeast genetics. (NY: Cold spring harbor press).
- Shevell, D.E., Leu, W.-M., Gillmor, C.S., Xia, G., Feldmann, K.A., and Chua, N.-H. (1994).** EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell* 77, 1051–1062.
- Shih, H.-W., DePew, C.L., Miller, N.D., and Monshausen, G.B. (2015).** The Cyclic Nucleotide-Gated Channel CNGC14 Regulates Root Gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 25, 3119–3125.
- Sieburth, L.E., Muday, G.K., King, E.J., Benton, G., Kim, S., Metcalf, K.E., Meyers, L., Seamen, E., and Van Norman, J.M. (2006).** SCARFACE encodes an ARF-GAP that is required for normal auxin efflux and vein patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1396–1411.
- Sievers, A., Behrens, H.M., Buckhout, T.J., and Gradmann, D. (1984).** Can a Ca^{2+} pump in the endoplasmic reticulum of the *Lepidium* root be the trigger for rapid changes in membrane potential after gravistimulation? *J. Plant Physiol.* 114, 195–200.
- Smith, H., and Whitelam, G.C. (1997).** The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ.* 20, 840–844.
- Somers, D.E., Devlin, P.F., and Kay, S.A. (1998).** Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 282, 1488–1490.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., and Kay, S.A. (2000).** ZEITLUPE Encodes a Novel Clock-Associated PAS Protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101, 319–329.

Song, I., Lu, C.R., Brock, T.G., and Kaufman, P.B. (1988). Do Starch Statoliths Act as the Gravisensors in Cereal Grass Pulvini? *Plant Physiol.* *86*, 1155–1162.

Song, X.-F., Yang, C.-Y., Liu, J., and Yang, W.-C. (2006). RPA, a class II ARFGAP protein, activates ARF1 and U5 and plays a role in root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *141*, 966–976.

van der Spek, P.J., Kobayashi, K., Bootsma, D., Takao, M., Eker, A.P., and Yasui, A. (1996). Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors. *Genomics* *37*, 177–182.

Spencer, H. (1864). *The Principles of Biology* (Williams and Norgate).

Stapleton, A.E., and Walbot, V. (1994). Flavonoids Can Protect Maize DNA from the Induction of Ultraviolet Radiation Damage. *Plant Physiol.* *105*, 881–889.

Stefano, G., Renna, L., Rossi, M., Azzarello, E., Pollastri, S., Brandizzi, F., Baluska, F., and Mancuso, S. (2010). AGD5 is a GTPase-activating protein at the trans-Golgi network. *Plant J.* *64*, 790–799.

Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K., and Jürgens, G. (1999). Coordinated Polar Localization of Auxin Efflux Carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* *286*, 316–318.

Stoelzle, S., Kagawa, T., Wada, M., Hedrich, R., and Dietrich, P. (2003). Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1456–1461.

Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J.S., Nandra, S.K., and Privé, G.G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* *6*, R82.

Stone, B.B., Stowe-Evans, E.L., Harper, R.M., Celaya, R.B., Ljung, K., Sandberg, G., and Liscum, E. (2008). Disruptions in AUX1-dependent auxin influx alter hypocotyl phototropism in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* *1*, 129–144.

Sullivan, S., Thomson, C.E., Kaiserli, E., and Christie, J.M. (2009). Interaction specificity of *Arabidopsis* 14-3-3 proteins with phototropin receptor kinases. *FEBS Lett.* *583*, 2187–2193.

Swarup, R., and Bennett, M.J. (2009). Root Gravitropism. In *Annual Plant Reviews Volume 37: Root Development*, T. Beeckman, ed. (Wiley-Blackwell), pp. 157–174.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* *81*, 153–208.

Tanaka, H., Nodzyński, T., Kitakura, S., Feraru, M.I., Sasabe, M., Ishikawa, T., Kleine-Vehn, J., Kakimoto, T., and Friml, J. (2014). BEX1/ARF1A1C is Required for BFA-Sensitive Recycling of PIN Auxin Transporters and Auxin-Mediated Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* *55*, 737–749.

Tanz, S.K., Castleden, I., Hooper, C.M., Vacher, M., Small, I., and Millar, H.A. (2013). SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* *41*, D1185–D1191.

Tao, L., Cheung, A.Y., and Wu, H. (2002). Plant Rac-Like GTPases Are Activated by Auxin and Mediate Auxin-Responsive Gene Expression. *Plant Cell* *14*, 2745–2760.

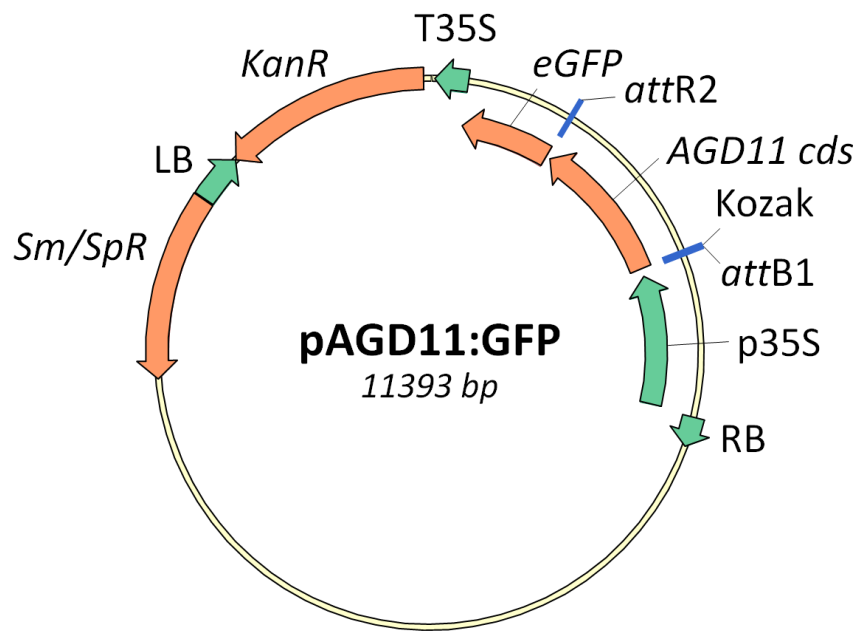
Thermo Scientific (2016). Phire Plant Direct PCR Kit Manual.

- Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T., and Ikenaga, M. (1996).** Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* 272, 109–112.
- Tognetti, J.A., Pontis, H.G., and Martínez-Noël, G.M.A. (2013).** Sucrose signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 8.
- Toyota, M., Furuichi, T., Tatsumi, H., and Sokabe, M. (2008a).** Cytoplasmic calcium increases in response to changes in the gravity vector in hypocotyls and petioles of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 146, 505–514.
- Toyota, M., Furuichi, T., Tatsumi, H., and Sokabe, M. (2008b).** Critical consideration on the relationship between auxin transport and calcium transients in gravity perception of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Signal. Behav.* 3, 521–524.
- Toyota, M., Furuichi, T., Sokabe, M., and Tatsumi, H. (2013).** Analyses of a Gravistimulation-Specific Ca^{2+} Signature in *Arabidopsis* using Parabolic Flights. *Plant Physiol.* 163, 543–554.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1997).** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963–1971.
- Vandenbrink, J.P., Kiss, J.Z., Herranz, R., and Medina, F.J. (2014).** Light and gravity signals synergize in modulating plant development. *Front. Plant Sci.* 5, 563.
- Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., and Nielsen, E. (2003).** Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131, 1191–1208.
- Visscher, A.M., Paul, A.-L., Kirst, M., Guy, C.L., Schuerger, A.C., and Ferl, R.J. (2010).** Growth performance and root transcriptome remodeling of *Arabidopsis* in response to Mars-like levels of magnesium sulfate. *PLoS One* 5, e12348.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. (2003).** Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949–956.
- Wan, Y., Jasik, J., Wang, L., Hao, H., Volkmann, D., Menzel, D., Mancuso, S., Baluška, F., and Lin, J. (2012).** The Signal Transducer NPH3 Integrates the Phototropin1 Photosensor with PIN2-Based Polar Auxin Transport in *Arabidopsis* Root Phototropism. *Plant Cell* 24, 551–565.
- Wang, K. (2006).** *Agrobacterium* Protocols Volume 1.
- Wayne, R., Staves, M.P., and Leopold, A.C. (1990).** Gravity-dependent polarity of cytoplasmic streaming in *Nitellopsis*. *Protoplasma* 155, 43–57.
- Weijers, D., Benkova, E., Jäger, K.E., Schlereth, A., Hamann, T., Kientz, M., Wilmoth, J.C., Reed, J.W., and Jürgens, G. (2005).** Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J.* 24, 1874–1885.
- Went (1926).** On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa* - PU00015412.pdf.

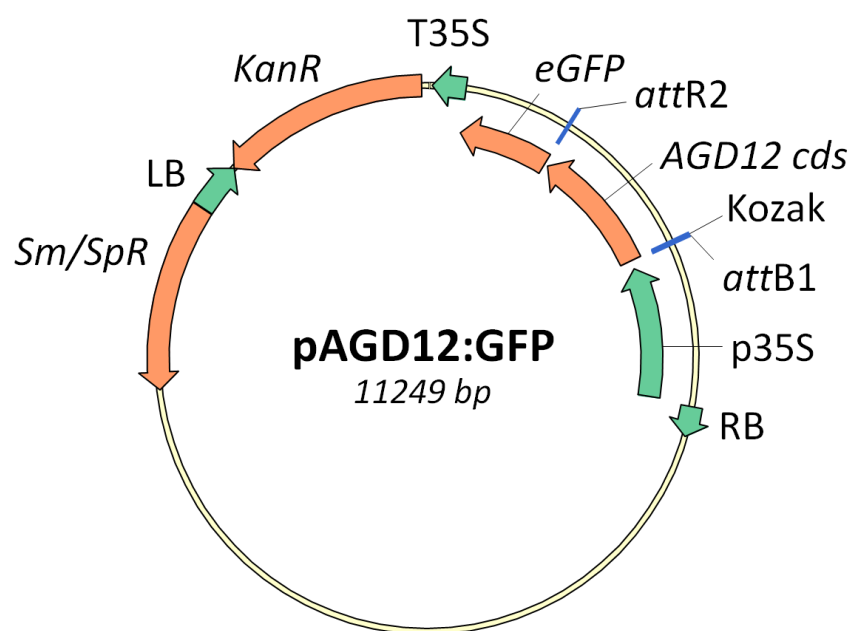
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., and Schmülling, T. (2003).** Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15, 2532–2550.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., et al. (2001).** Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 27, 581–590.
- Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S., and Harberd, N.P. (1993).** Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 5, 757–768.
- Wieland, F., and Hartert, C. (1999).** Mechanisms of vesicle formation: Insights from the COP system.
- Win, J., and Kamoun, S. (2004).** pCB301-p19: A Binary Plasmid Vector to Enhance Transient Expression of Transgenes by Agroinfiltration.
- Yamamoto, K., and Kiss, J.Z. (2002).** Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128, 669–681.
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., and Hafiz, I.A. (2013).** Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2837–2849.
- Yeh, K.C., Wu, S.H., Murphy, J.T., and Lagarias, J.C. (1997).** A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277, 1505–1508.
- Yoo, C.-M., Wen, J., Motes, C.M., Sparks, J.A., and Blancaflor, E.B. (2008).** A class I ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein is critical for maintaining directional root hair growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147, 1659–1674.
- Zhang, Y., Mayba, O., Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J.M., Speed, T.P., and Quail, P.H. (2013).** A Quartet of PIF bHLH Factors Provides a Transcriptionally Centered Signaling Hub That Regulates Seedling Morphogenesis through Differential Expression-Patterning of Shared Target Genes in *Arabidopsis*. *PLOS Genet.* 9, e1003244.
- Zou, J.-J., Zheng, Z.-Y., Xue, S., Li, H.-H., Wang, Y.-R., and Le, J. (2016).** The role of *Arabidopsis* Actin-Related Protein 3 in amyloplast sedimentation and polar auxin transport in root gravitropism. *J. Exp. Bot.* 67, 5325–5337.

7. Anhang/Plasmid-Karten

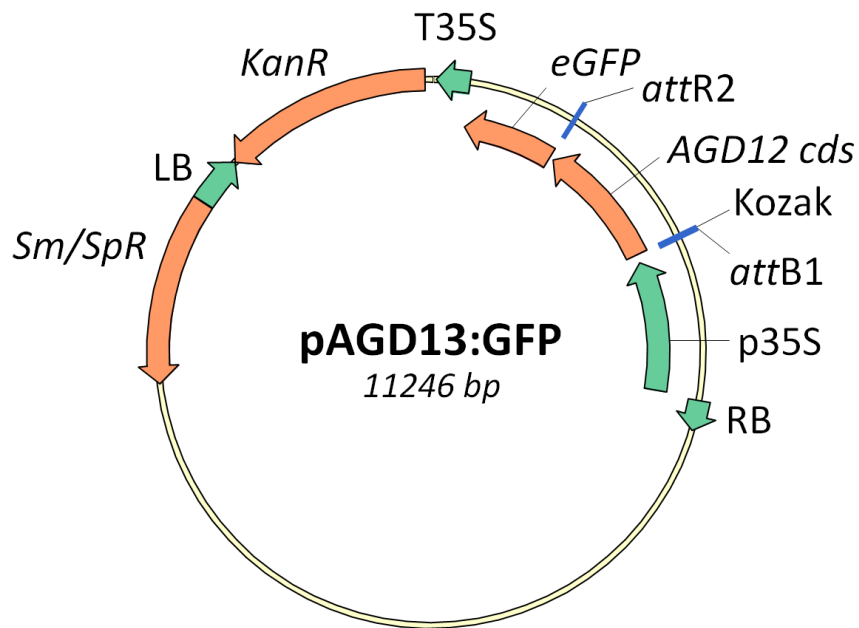
7. 1. pAGD11:GFP



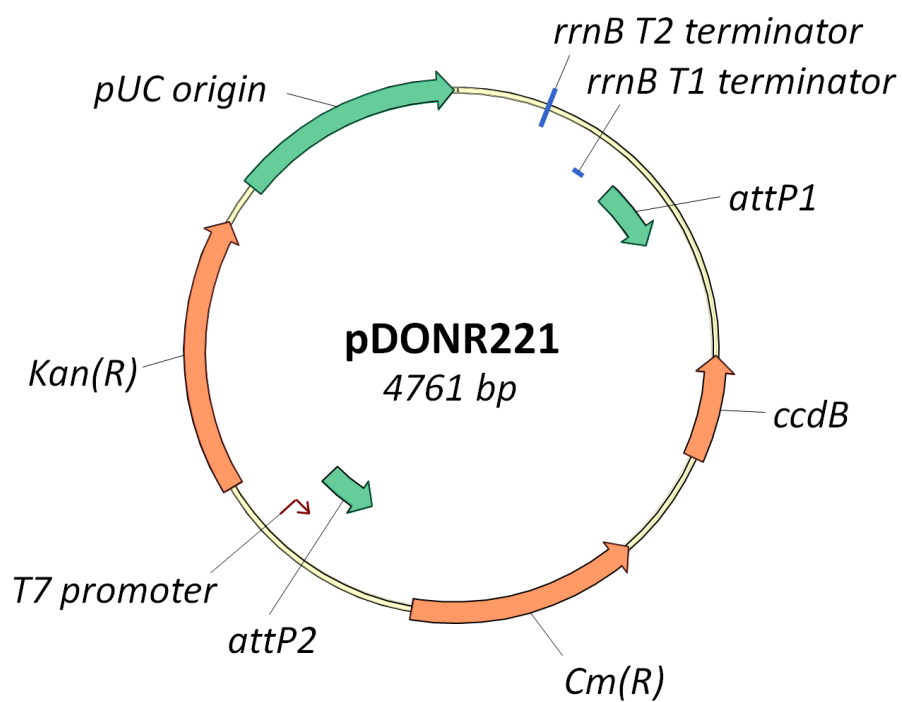
7. 2. pAGD12:GFP



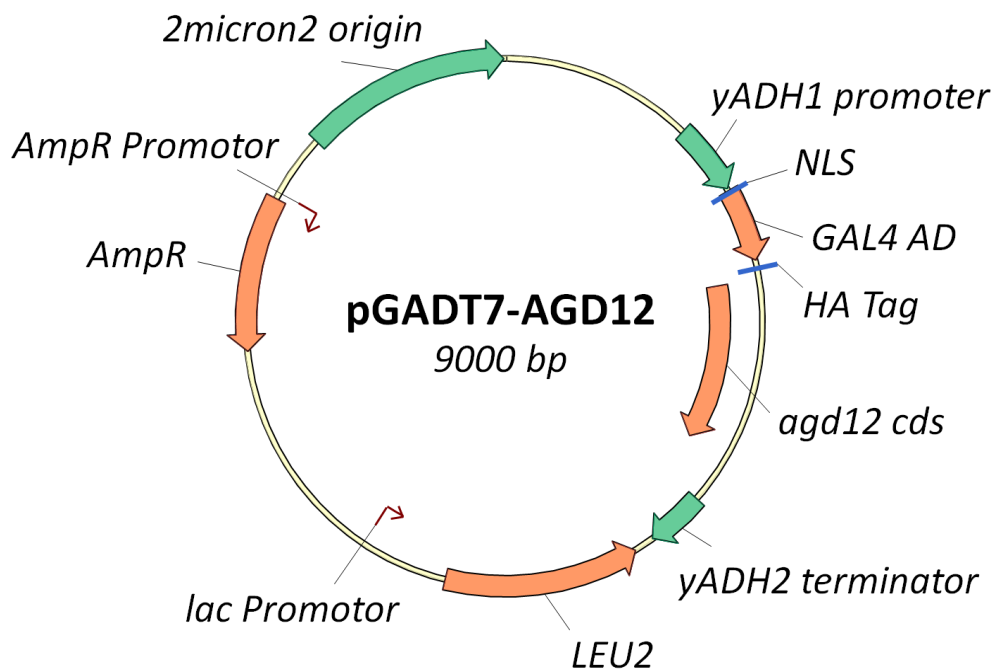
7. 3. pAGD13:GFP



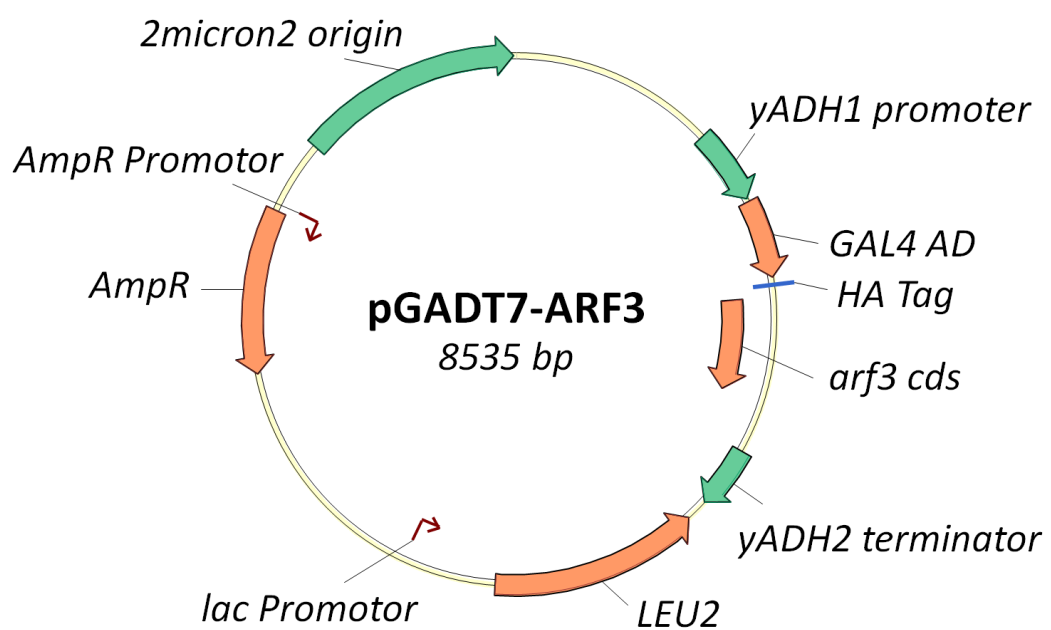
7. 4. pDONR221



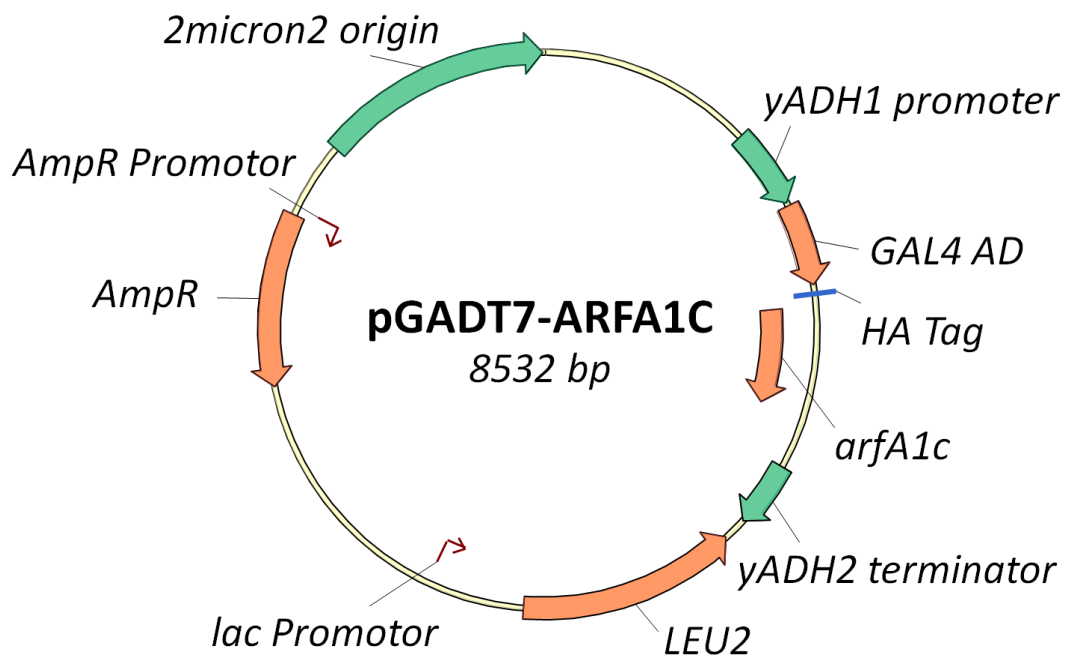
7. 5. pGADT7-AGD12



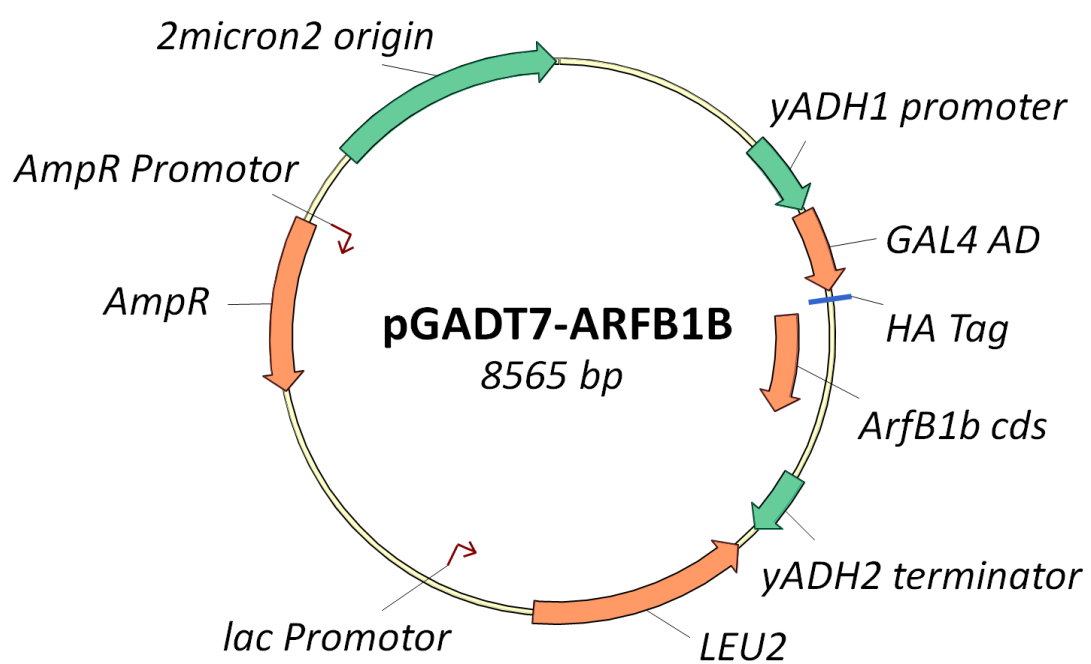
7. 6. pGADT7-ARF3



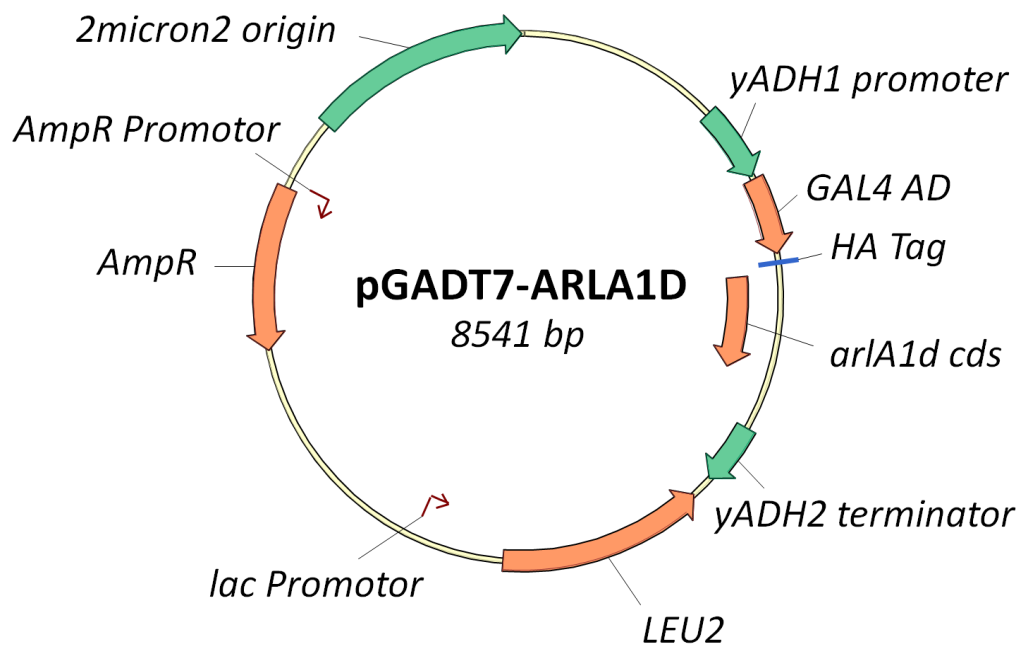
7. 7. pGADT7-ARFA1C



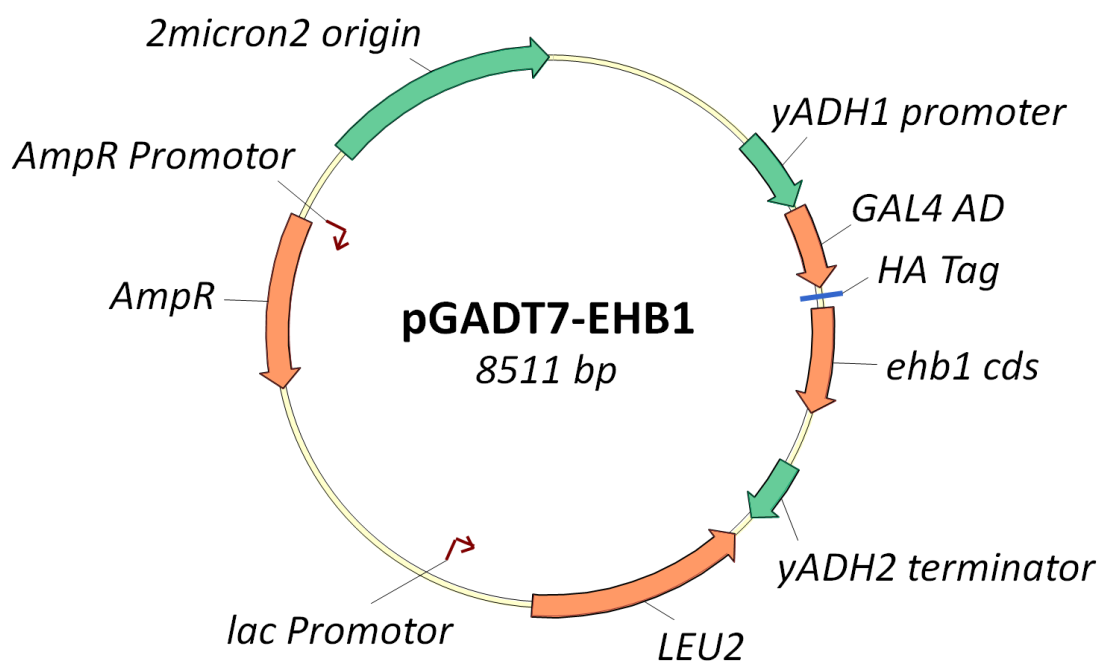
7. 8. pGADT7-ARFB1B



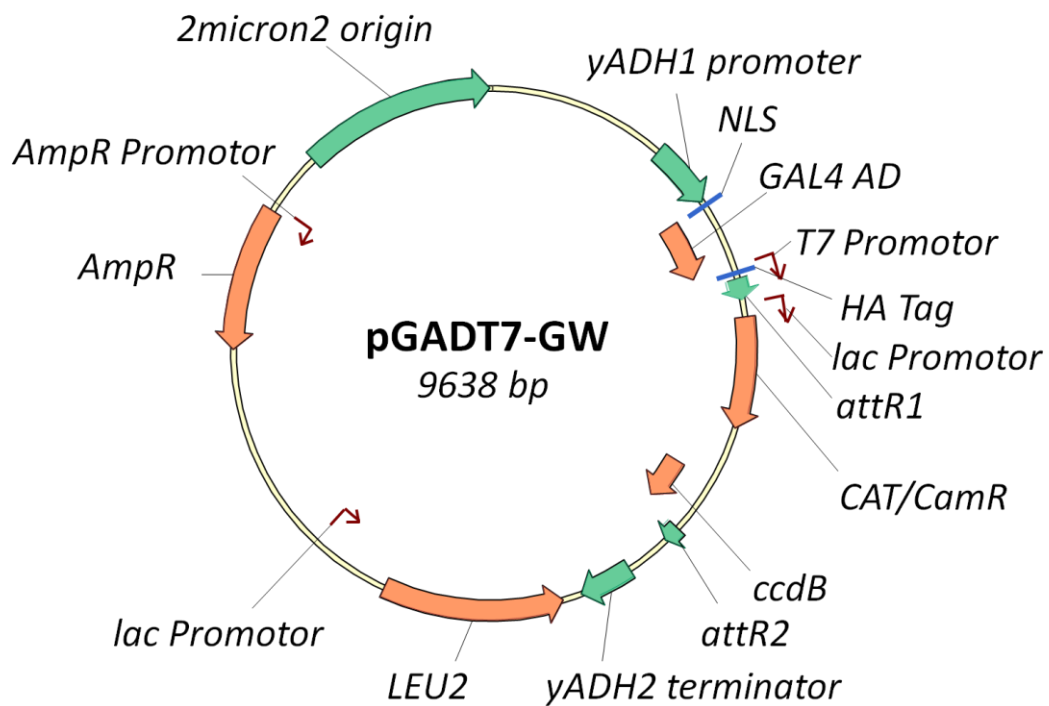
7. 9. pGADT7-ARLA1D



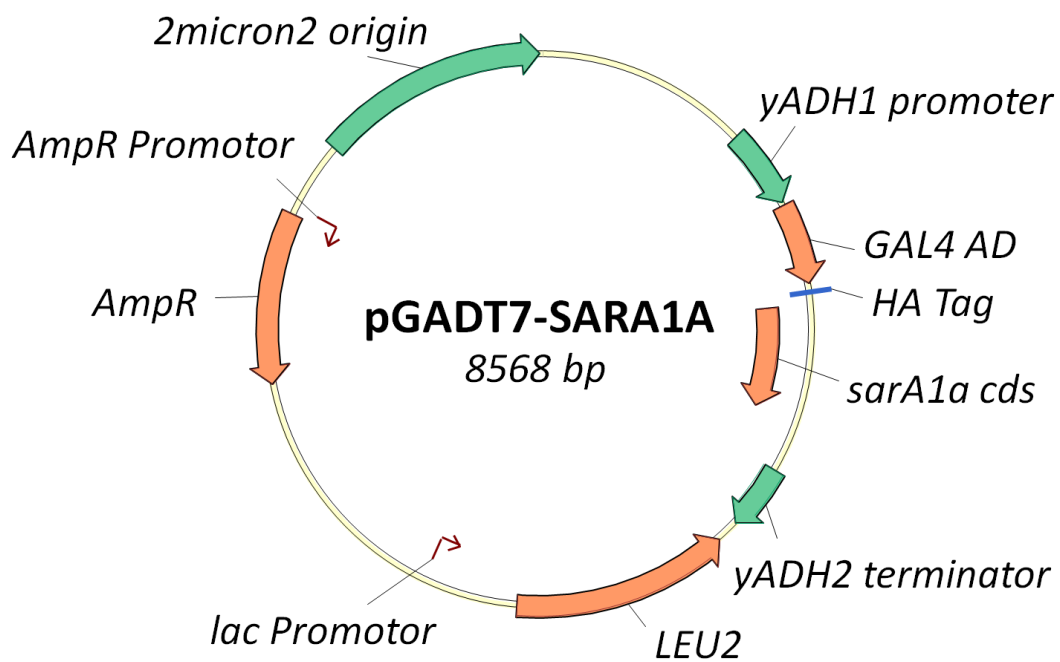
7. 10. pGADT7-EHB1



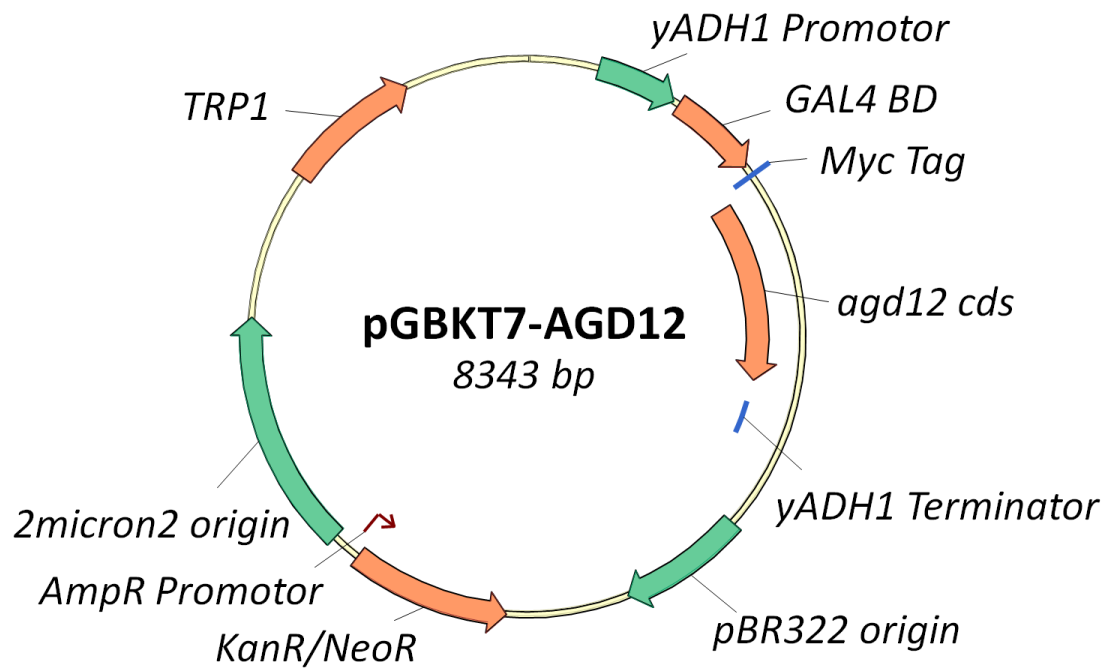
7. 11. pGADT7-GW (Lu et al., 2010)



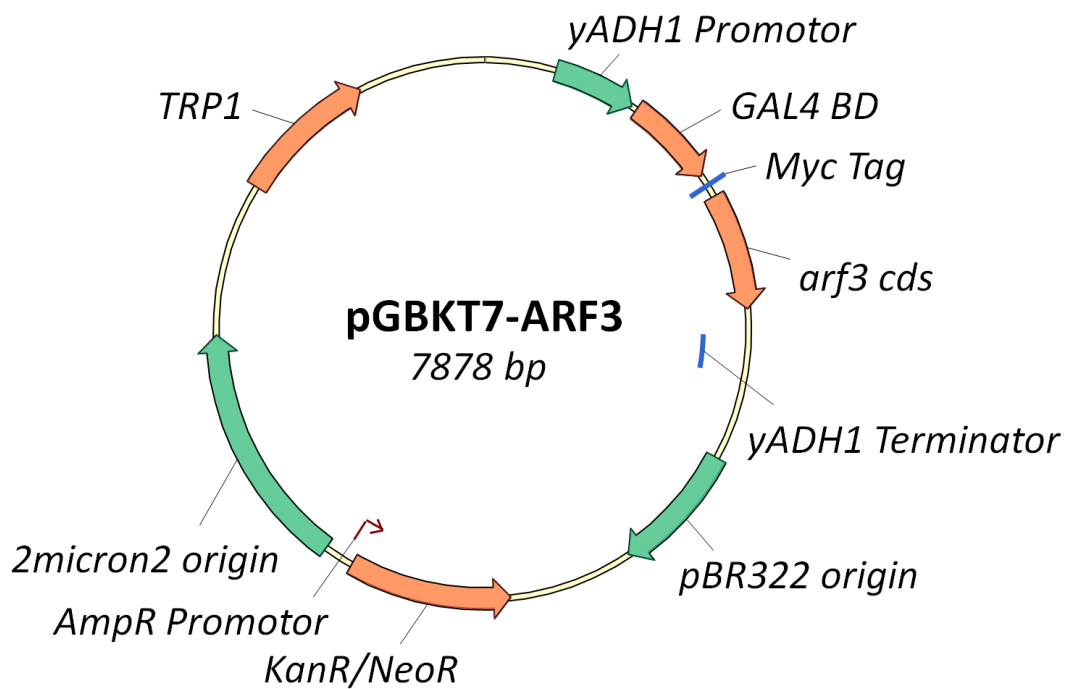
7. 12. pGADT7-SARA1A



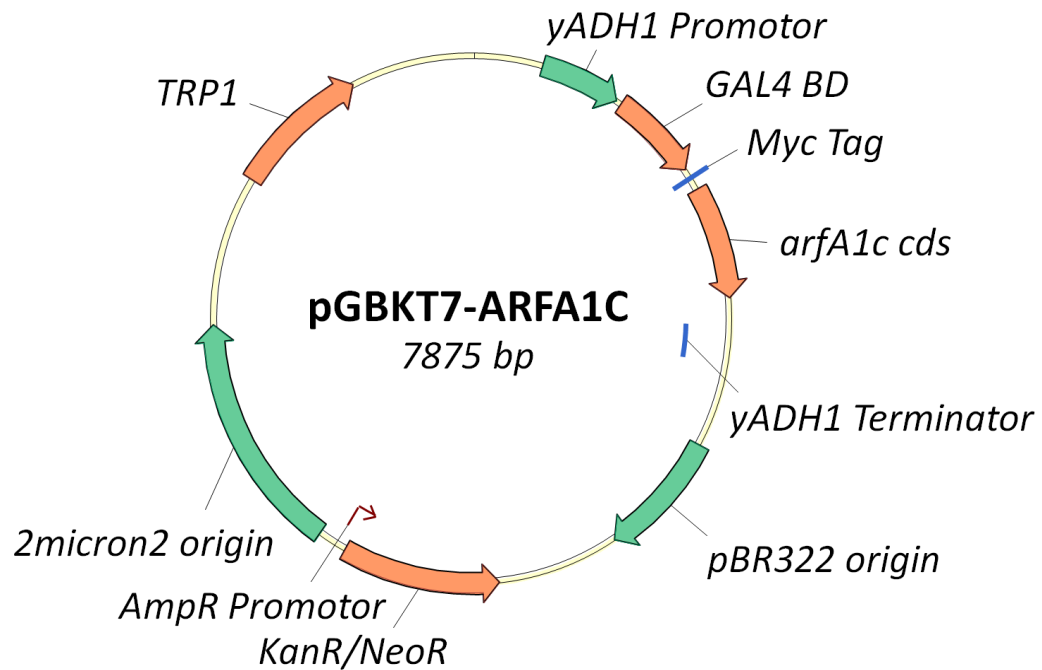
7. 13. pGBKT7-AGD12



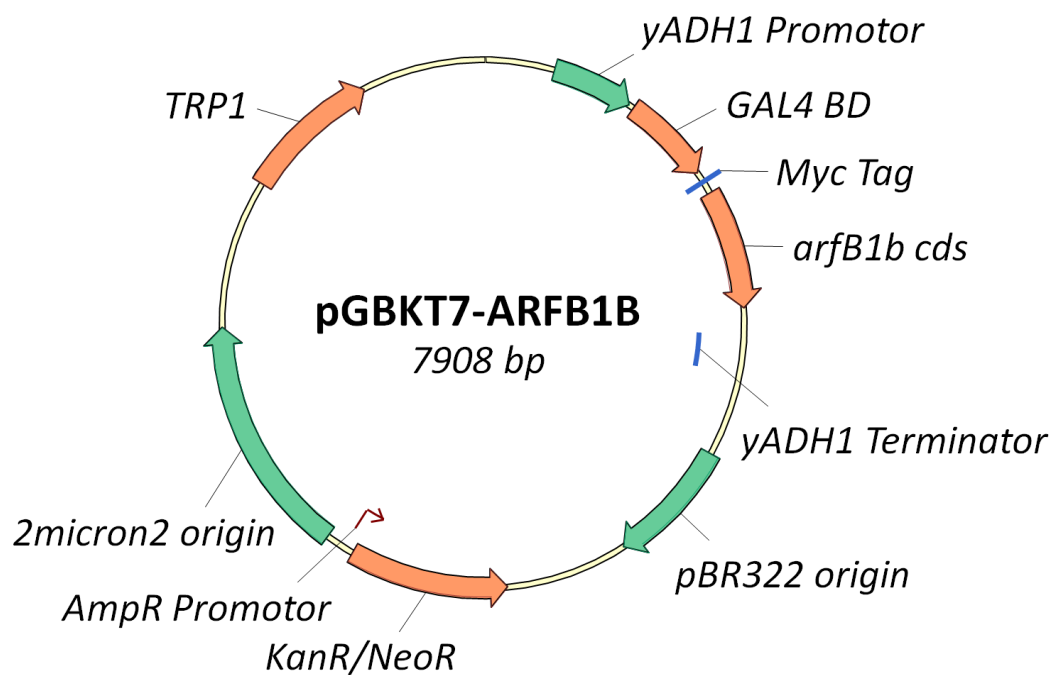
7. 14. pGBKT7-ARF3



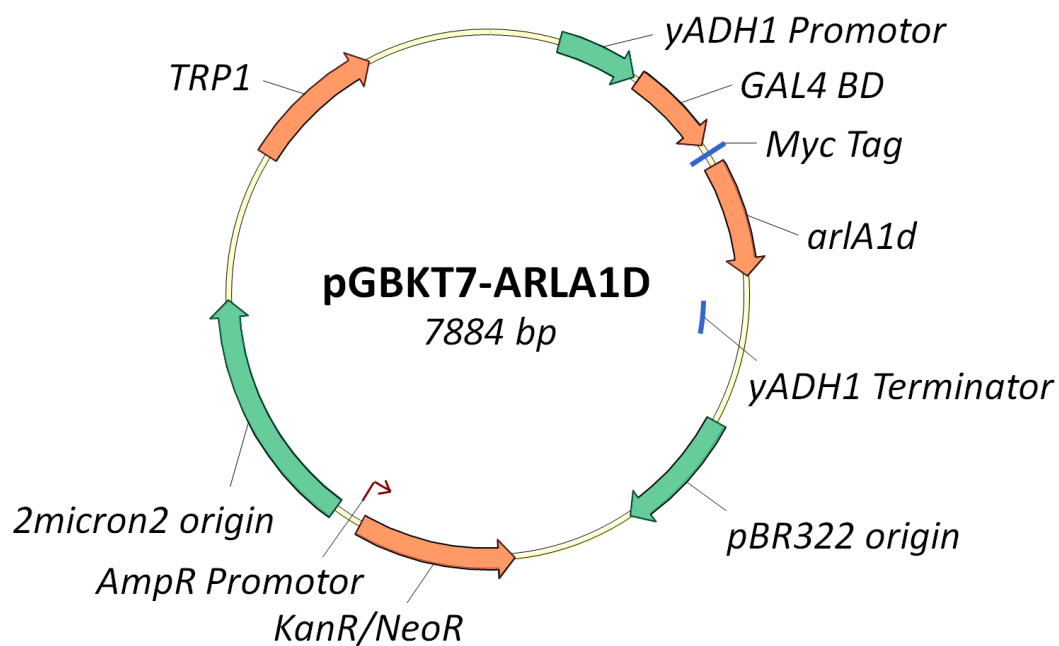
7. 15. pGBKT7-ARFA1C



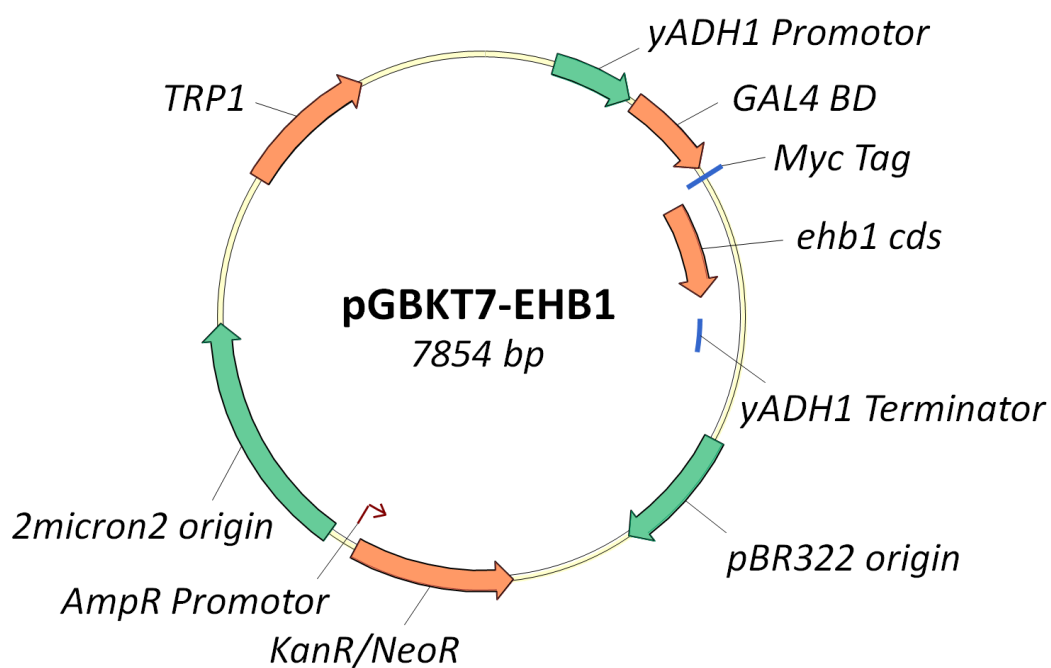
7. 16. pGBKT7-ARFB1B



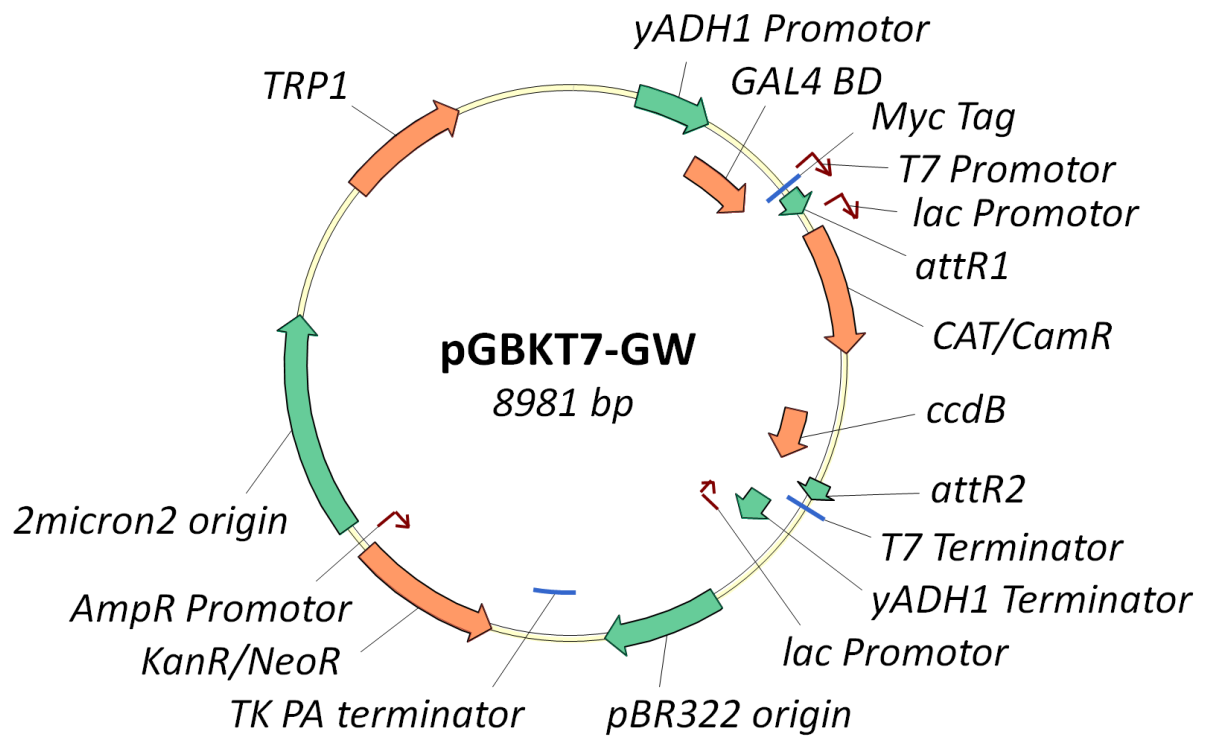
7. 17. pGBKT7-ARLA1D



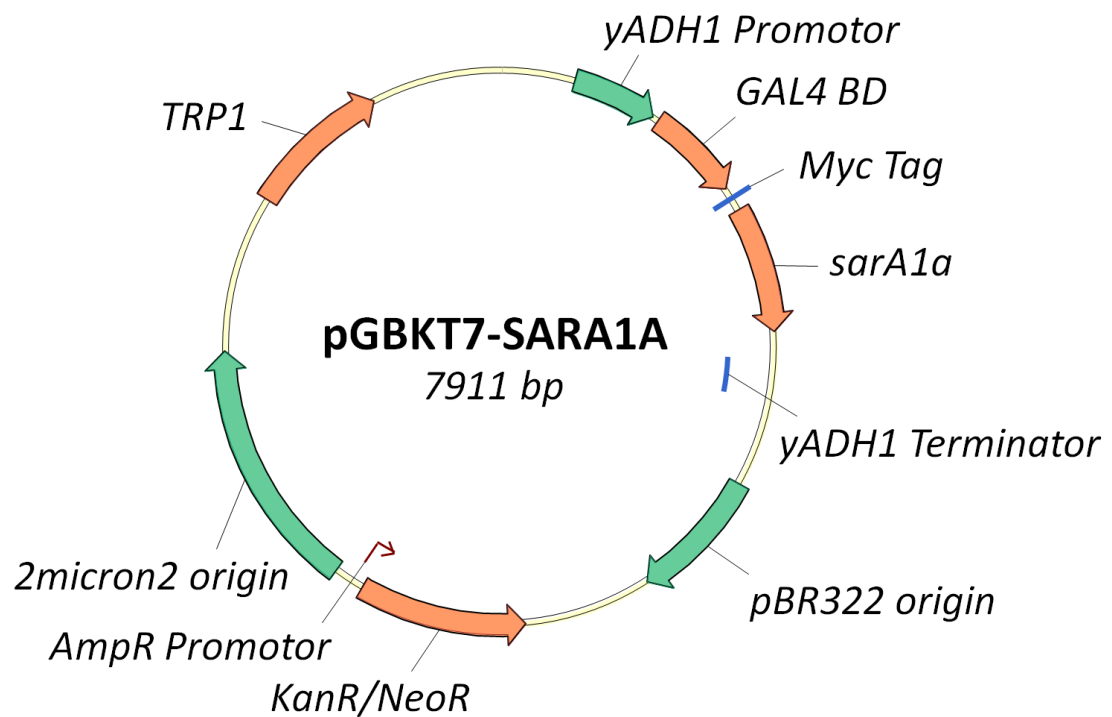
7. 18. pGBKT7-EHB1



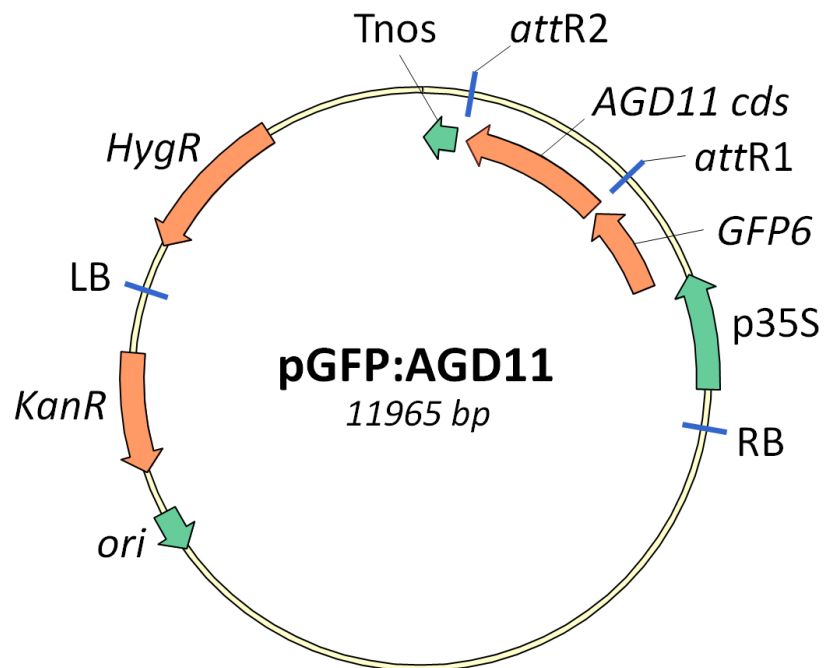
7. 19. pGBKT7-GW (Lu et al., 2010)



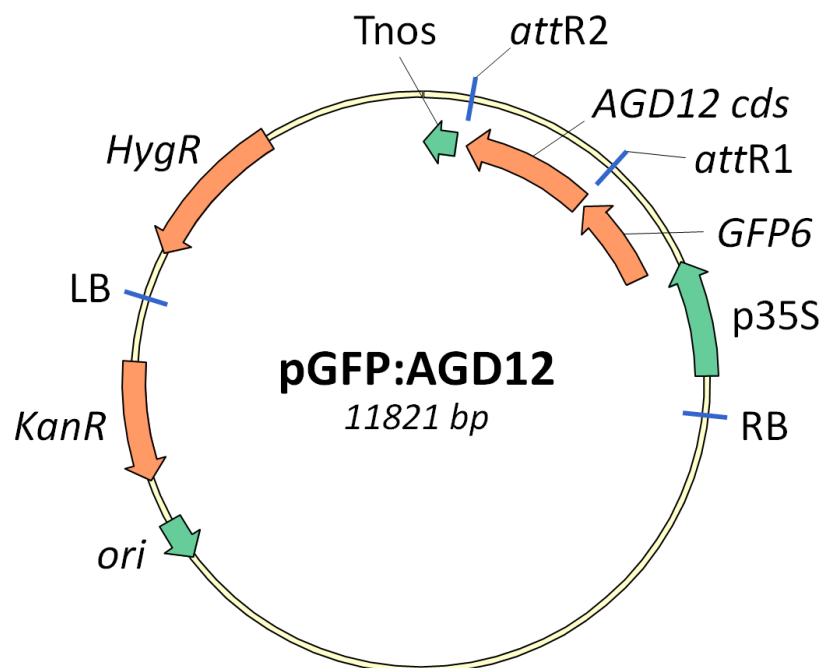
7. 20. pGBKT7-SARA1A



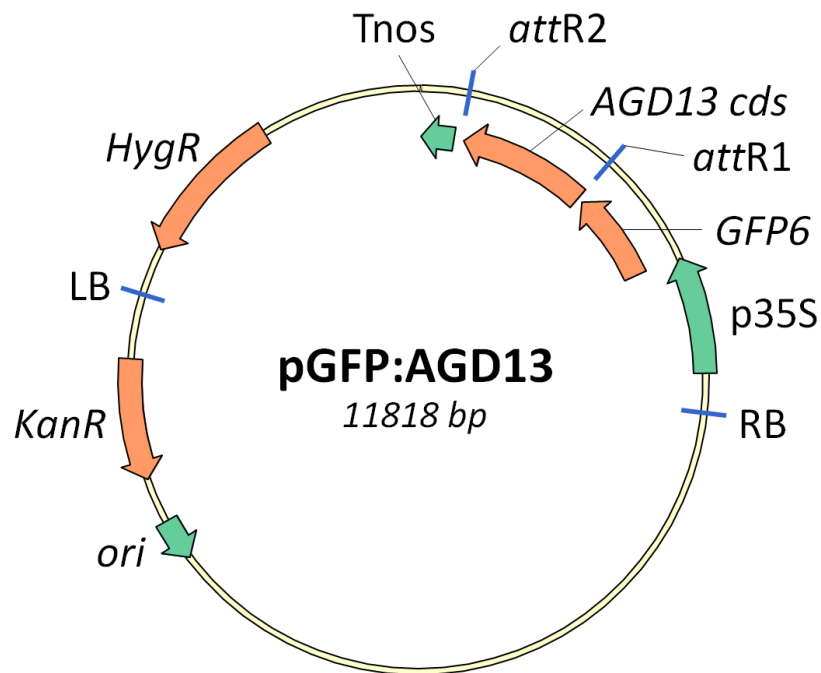
7. 21. pGFP:AGD11



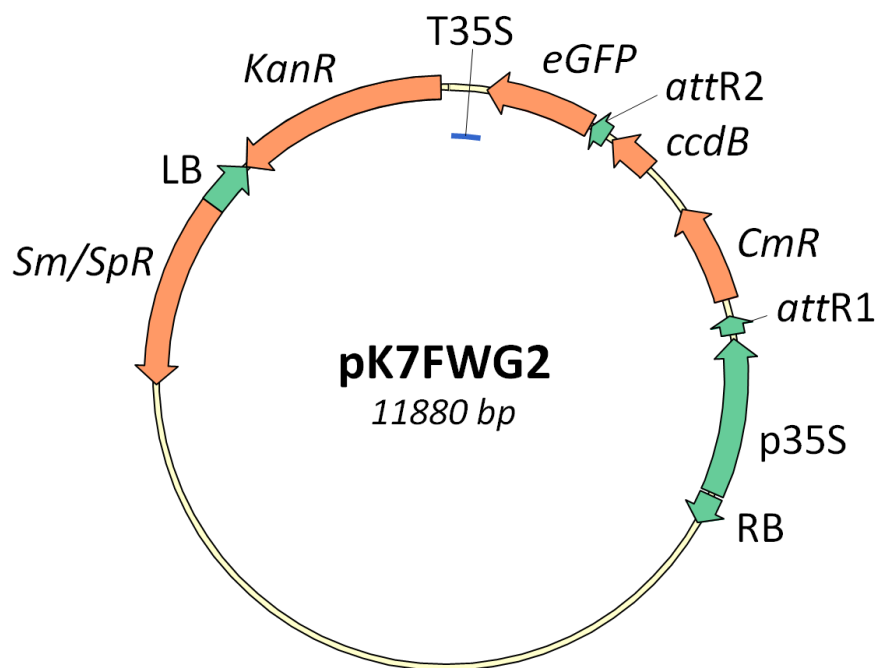
7. 22. pGFP:AGD12



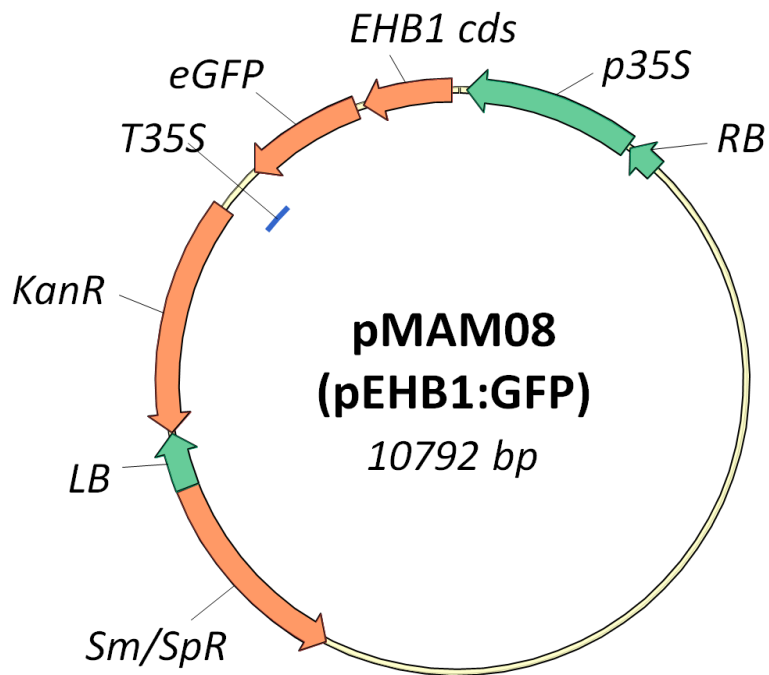
7. 23. pGFP:AGD13



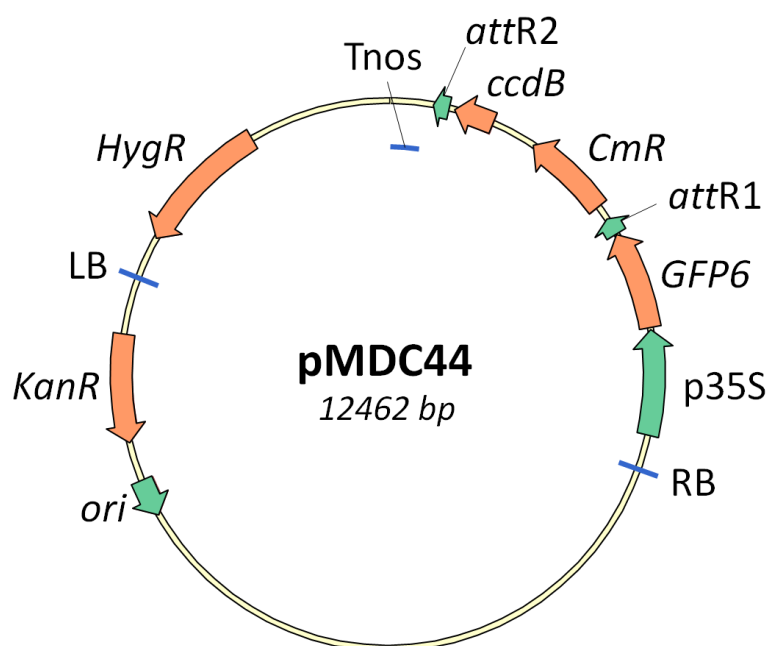
7. 24. pK7FWG2 (Bhaskar et al., 2009)



7. 25. pMAM08 (Midon, 2006)



7. 26. pMDC44 (Curtis and Grossniklaus, 2003)



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Christian Michalski
Geburtsdatum:	23. 02. 1984
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Berufserfahrung

11/2010 - 03/2017	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Philipps-Universität Marburg
10/2010 - 11/2010	Wissenschaftliche Hilfskraft bei Justus-Liebig-Universität Gießen

Akademische Ausbildung

10/2008 - 09/2010	Master of Science Biology, Justus-Liebig-Universität Gießen
10/2005 - 09/2008	Bachelor of Science Biology, Justus-Liebig-Universität Gießen
10/2004 - 09/2005	Diplom-Bio-Ingenieurwesen, Universität Halle-Wittenberg

Wehrersatzdienst

08/2003 - 06/2004	Kinder- und Jugendneuropsychiatrie, Krankenhaus Rochlitz
-------------------	--

Schulbildung

07/1994 - 06/2003	Conrad Felix-Müller Gymnasium, Geithain
07/1990 - 06/1994	Paul-Guenther-Schule, Geithain

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

„Die Rolle von AGD12 bei phototroper und gravitroper Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana*“

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner als der von mir ausgewiesenen Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat keinem sonstigen Prüfungszweck gedient.

Florstadt, den _____
